



EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOGENIQUES DE L'APORECEPTEUR DE L'HORMONE THYROÏDIENNE ALPHA 1 AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA SOURIS

Laure Pascale Quignodon

► To cite this version:

Laure Pascale Quignodon. EFFETS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOGENIQUES DE L'APORECEPTEUR DE L'HORMONE THYROÏDIENNE ALPHA 1 AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA SOURIS. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2007. Français. NNT: . tel-00159988

HAL Id: tel-00159988

<https://theses.hal.science/tel-00159988>

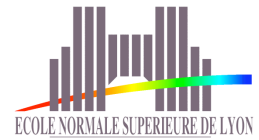
Submitted on 5 Jul 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre □ 407

N° attribué par la bibliothèque □ 07ENSL0 407



THESE

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lyon - Ecole Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : Sciences de la Vie

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule

Ecole doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrée et Cognitive

Présentée et soutenue publiquement le 14/06/2007

par Mademoiselle Laure QUIGNODON

Titre □

Effets physiologiques et pathogéniques de l'aporécepteur de l'hormone thyroïdienne alpha 1 au cours du développement de la souris

Directeur de thèse □ Monsieur Frédéric FLAMANT

Après avis de □

Madame Béatrice DESVERGNE, *Membre/Rapporteur*
Monsieur Jean MARIANI, *Membre/Rapporteur*

Devant la Commission d'examen formée de :

Madame Béatrice DESVERGNE, *Membre/Rapporteur*
Monsieur Frédéric FLAMANT, *Membre*
Monsieur Florian GUILLOU, *Membre*
Monsieur Pierre JURDIC, *Membre*
Monsieur Jean MARIANI, *Membre/Rapporteur*
Monsieur Jacques SAMARUT, *Membre*

REMERCIEMENTS

Je remercie mon vénéré mentor, Frédéric Flamant, dont la culture scientifique a pour seul égal son sens de l'humour. Merci pour la formation scientifique et les conseils techniques parfois originaux ☐ Merci de m'avoir guidé vers le pays merveilleux des souris transgéniques, même si j'ai laissé ma paire de kickers en route... Merci de ton indulgence pour les menus emprunts de monnaie et la lecture matinale de l'horoscope. Merci enfin d'être gentil le jour de la thèse pour épargner mon entourage qui s'est saigné aux quatre veines pour cette thèse.

Je remercie Jacques Samarut de m'avoir accueillie dans son laboratoire, d'avoir participé à mon encadrement et donné les moyens de réaliser cette thèse. Grâce à ses conseils, j'ai pu progresser tout au long de ces quatre années.

Je remercie Béa, Karine et Séverine pour leurs qualités humaines, leur écoute permanente et leurs conseils scientifiques. Merci entre autres pour la lecture du manuscrit. Merci surtout de votre soutien au quotidien. Merci d'avoir été là dans les moments de doute.

Je remercie mes compagnons de labeur et de débats Manu et Fabrice. Pour tout ce que nous avons partagé au cours de ces années. Pour ces soirées ou pauses consacrées aux ☐ « Est-ce que tu penses que je pense qu'il pense ☐ », « La vie, la mort ☐ », « La famine, je suis contre ☐ ».

Je remercie les membres de l'équipe Flamant, en particulier Denise, pour m'avoir appris à cultiver les ES et m'avoir toujours donné des conseils sages.

Merci à Nicolas, à Eva et à Frédéric Picou pour les échanges scientifiques amicaux, voire passionnés ☐

Je remercie mes parents, mes sœurs Lise et Valérie, Fabien et ma tante pour leur soutien pendant cette thèse et leur indulgence pour les souris sacrifiées.

Une bise à la petite.

Je remercie Marie et Camille pour la force et la durée de leur amitié.

Je remercie mes petits camarades de DEA ☐ Amel, Lud Céline et Cyril, ainsi que les morues vétérinaires ☐ Lulu, Laurette, Kwet, Titine et Vio.

Je remercie Stéphane pour tout ce qu'il est.

Je remercie les membres du jury ☐ d'avoir accepté d'accorder de leur temps à la lecture de ce mémoire.

Il n'y a rien d'intelligent à ne pas être heureux

Arnaud Desjardins

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	4
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
RESUME.....	11
INTRODUCTION.....	14
I. Effets physiologiques de l'hormone thyroïdienne	14
A. Présentation de l'hormone thyroïdienne	14
a. Une hormone produite de façon très contrôlée.....	14
b. Mode d'action moléculaire□les récepteurs de l'hormone thyroïdienne.....	18
1. Régulation transcriptionnelle dépendante du ligand.....	18
2. Les récepteurs nucléaires de l'hormone thyroïdienne.....	20
3. Effets non génomiques de T3	24
c. Un déficit d'hormone thyroïdienne conduit à une pathologie sévère	25
1. Tableau clinique.....	25
2. Etiologie	26
3. Traitement.....	26
B. Intérêt d'étudier les récepteurs de l'hormone thyroïdienne.....	27
a. L'hypothyroïdie, un problème actuel de santé publique	27
1. Hypothyroïdies modérées et fonctionnelles	27
2. Hypothyroïdie foetale.....	28
3. Perturbateurs thyroïdiens.....	28
b. Les récepteurs de l'hormone thyroïdienne sont potentiellement des oncogènes	30
c. Les TR sont des cibles thérapeutiques potentielles.....	31
d. Les TR sont de puissants outils moléculaires.....	32
C. Fonctions des TR au cours de l'évolution	33
a. Actions primitives de l'hormone thyroïdienne	33
b. Rencontre de l'hormone thyroïdienne et des TR.....	34
c. Les deux gènes <i>THRA</i> et <i>THRB</i> sont présents chez les poissons	35
d. Amplification de la réponse à l'hormone thyroïdienne chez les Amphibiens	35
e. Diversification des fonctions des TR chez les mammifères.....	36
D. Actions de l'hormone thyroïdienne chez la souris	37
a. Intérêt du modèle souris	38
1. Les modèles d'hypothyroïdie	38
2. Les souris Pax8 ^{-/-}	39
3. Les souris invalidées pour une ou plusieurs isoformes de TR	40

b. Actions pléiotropiques de l'hormone thyroïdienne sur le développement et la physiologie adulte.....	42
II. Mécanismes moléculaires d'action de l'hormone thyroïdienne.....	45
A. Modulation de la signalisation de T3 par la disponibilité de l'hormone thyroïdienne.....	45
a. Disponibilité de T3 dans le milieu extra-cellulaire.....	45
1. Dans la rétine	45
2. Dans le cerveau.....	46
b. Franchissement des membranes plasmiques	48
B. Régulation de la signalisation de T3 dans le noyau.....	49
a. Le mode d'action des TR est dynamique.....	49
1. Navette nucléo-cytoplasmique.....	49
2. Cycles transcriptionnels	50
b. TR n'a pas de cofacteur spécifique.....	52
c. La spécificité d'action des TR s'expliquerait par le code des histones.....	54
d. Les cofacteurs intègrent de nombreux signaux cellulaires	58
C. Régulation de l'expression d'un gène-cible	59
a. Spécificité des TRE.....	59
b. Spécificité des isoformes de TR recrutées sur un TRE.....	60
D. Les TR interviennent dans des régulations croisées	62
a. Effet coopératif	62
b. Compétition de liaison sur un DR4	63
c. Fixation de TR sur les éléments de réponse d'autres récepteurs nucléaires	64
d. Régulations indirectes	65
E. Les limites du modèle classique.....	66
a. La régulation négative.....	67
b. Les effets non génomiques.....	68
1. Activation de voies cytoplasmiques par T3	70
2. Activation de voies cytoplasmiques par TR / T3.....	71
3. Effets non génomiques indépendants de TR	72
III. Intérêts et limites des modèles actuels de souris mutantes	74
A. Une mutation de TR n'est pas équivalente à une délétion de TR	74
a. Les souris dépourvues de TR n'ont pas un phénotype hypothyroïdien	74
1. L'aporécepteur TR α est responsable de la mort des souris Pax8 ^{-/-}	74
2. L'aporécepteur TR α est responsable du retard de migration des cellules granulaires externes dans le cervelet post-natal	76
b. Des mutations de <i>THRA</i> reproduisent une hypothyroïdie sévère.....	78
c. Implication d'un aporécepteur TR β	79
1. Implication dans l'hypercholestérolémie	80
2. Implication dans le phénotype cérébral.....	80
3. Implication dans la tumorigénèse	81

B. Nécessité d'un nouveau modèle pour comprendre les fonctions biologiques complexes	83
a. Actions directes et indirectes de T3	83
1. Actions directes et indirectes de T3 sur les progéniteurs cellulaires	83
2. Difficulté de séparer les actions développementales des actions physiologiques	90
b. Le système de recombinaison CRE/loxP	94
C. Conclusion et objectifs de la thèse	95
RESULTATS	97
I. La signalisation de T3 dans le cerveau en développement est hétérogène	97
A. Démarche scientifique	97
B. Résumé de l'article 1	98
C. Article 1	100
D. Commentaires	101
E. Résultats non publiés	102
a. Implication d'HAIRLESS	102
b. Implication des DEIODASES	103
c. Transport de l'hormone	103
d. Conclusion	105
II. L'aporrécepteur TR α est un modificateur moléculaire de la fonction cardiaque entre la vie fœtale et la vie post-natale	106
A. Démarche scientifique	106
B. Résumé de l'article 2	106
C. Article 2	108
III. Identification des gènes-cibles directs T3 dans le cervelet post-natal	109
A. Démarche scientifique	109
B. Résumé de l'article 3	110
C. Article 3	111
IV. Génèse d'un nouveau modèle de souris mutantes conditionnelles pour le récepteur TR α 1	112
A. Démarche scientifique	112
B. Résumé de l'article 4	112
C. Article 4	115
D. Résultats non publiés	116
a. Perturbation transcriptionnelle dans les cervelets TR $\alpha^{AM/xS}$ à P15	116
b. Métabolisme glucidique	116
1. Introduction	116
2. Matériel et méthode	118
3. Résultats	120
4. Discussion	122

DISCUSSION – PERSPECTIVES	125
I. L'aporécepteur TR α 1 et effets pathologiques et physiologiques	125
A. Prédominance des actions génomiques de TR α 1 dans la pathogénie de l'hypothyroïdie	125
B. Rôle de TR α dans la transition périnatale	126
C. Rôles physiologiques de l'aporécepteur TR pendant le développement embryonnaire	127
II. Action neurodéveloppementale de T3	128
A. Expliquer l'hétérogénéité de la signalisation de T3	128
B. Modèle de cascades moléculaires induites par T3 dans le cervelet post-natal	129
a. Le nombre faible de gènes-cibles directs de T3 suggère des activations en cascade	129
b. Action neurodéveloppementale des gènes-cibles directs de T3	130
c. Activation indirecte de cascades impliquées dans le neurodéveloppement	131
C. Origine de la persistance anormale de la couche granulaire externe	132
a. TR n'a pas un effet cellule autonome sur les cellules granulaires externes	132
b. Les cellules de Purkinje pourraient être impliquées	133
D. L'aporécepteur TR α 1 induit une dérégulation du transcriptome dans le cerveau embryonnaire	135
III. Intérêt des modèles génétiques générés	136
A. Utilisation des souris TR α^{AM}	136
B. Intérêt pour disséquer les interactions tissulaires	138
a. Origine métabolique du phénotype cérébelleux	138
b. Origine centrale du phénotype métabolique	139
C. Intérêt pour disséquer les actions développementales et adultes de T3	140
D. Intérêt pour trouver tous les gènes-cibles de TR	141
E. Intérêt pour la recherche appliquée	141
a. Pour détecter les perturbateurs endocriniens	142
b. Pour proposer un dépistage précoce de l'hypothyroïdie maternelle	142
F. Conclusion	143
CONCLUSION GENERALE	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146

LISTE DES FIGURES

Figure 1 □ Structure chimique □

- de l'hormone thyroïdienne la 3, 5, 3' triiodothyronine ou T3
- de son précurseur: la 3, 5, 3', 5' tétraiodothyronine ou thyroxine ou T4

Figure 2 : Métabolisme de l'hormone thyroïdienne

Figure 3 : Régulation de la production de l'hormone thyroïdienne par l'axe hypothalamo-hypophysaire

Figure 4 : Structure des TR

Figure 5 : L'hormone thyroïdienne T3 régule la transcription de gènes-cibles

Figure 6 : Le gène *THRA* code pour sept isoformes chez la souris

Figure 7 : Le gène *THRB* code pour deux isoformes chez la souris

Figure 8 : Allèles mutants pour les gènes codant pour les TR chez la souris

Figure 9 : Modèle de régulation transcriptionnelle cyclique médiée par TR

Figure 10 : Modifications post-traductionnelles de la queue des histones induites par la fixation de T3 sur TR

Figure 11 : Rôle des cofacteurs dans la spécificité d'action des TR

Figure 12 : Actions génomiques et non génomiques de T3

Figure 13 : L'absence de TR est moins délétère que la présence d'un aporécepteur

Figure 14 □ L'aporécepteur TR α est responsable de la persistance anormale de la couche granulaire externe à P21 lors d'hypothyroïdie

Figure 15 : Actions directes et indirectes de T3 sur le développement de l'os

Figure 16 : Action de l'hormone thyroïdienne au cours de la différenciation des cellules neurales du cervelet

Figure 17 : Le système de recombinaison CRE/*loxP*

Figure 18 : La délétion de la *D3* perturbe la signalisation de T3 dans le cortex post-natal et adulte

Figure 19 : Altération de l'expression de nouveaux gènes-cibles dans le cervelet des souris TR $\alpha^{AM/+/xS}$ à P15

Figure 20 : Tests de tolérance au glucose chez les mutants TR $\alpha^{AM/}$

Figure 21 : Analyse des gaz respirés par les souris TR $\alpha^{AM/+/xS}$

Figure 22 : Modèle d'action indirecte de T3 sur la couche granulaire externe

LISTE DES ABREVIATIONS

BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
CAR □ Récepteur Androstane Constitutif
CGI □ Couche Granulaire Interne
CGE □ Couche Granulaire Externe
COUP-TF □ Facteur de transcription du promoteur en amont du gène de l'ovalbumine de poulet
CP □ Couche des cellules de Purkinje
D1 □ Déiodase 1
D2 : Déiodase 2
D3 : Déiodase 3
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
DR4 □ Répétition Directe du motif AGGTCA espacée de 4 nucléotides
DNA-PKcs □ Sous unité catalytique d'une kinase dont l'activité dépend de l'ADN
Ex : x^{ème} jours de vie embryonnaire
ER □ Récepteur des oestrogènes
ER6 □ Répétition Inversée du motif AGGTCA, espacées de 6 nucléotides
Find : Auto-induction dirigée par le récepteur nucléaire
FXR □ Récepteur des acides biliaires (Farnesoid X Récepteur)
GAL4-RE □ Élément de réponse à GAL4
GFAP □ Protéine Fibrillaire Gliale Acide
GFP □ Protéine Fluorescente verte
GH □ Hormone de croissance
GHRE □ Récepteur de GH
GR □ Récepteur des Glucocorticoïdes
GRE : Élément de Réponse aux GR
HAT : Histone Acétyl Transférase
HDAC : Histone Déacétylase
IR0 : Répétition palindromique de la séquence AGGTCA
IGF1 □ Facteur de croissance 1 apparenté à l'insuline
IGF1R □ Récepteur d'IGF1
IRESE □ Site interne d'entrée du ribosome
kb : Kilo paires de bases
LBD : Domaine de liaison du Ligand
LXR : Récepteur nucléaire des oxystérols (Liver X Receptor)
MAPK : Protéine Kinase Activée par les Mitogènes
MCT8 : Transporteur d'acides MonoCarboxiliques 8
MMI : Méthimazole
MRG1 : Gène 1 relié au site d'intégration du virus myéloïde écotrope
MTU : Méthylthiouracile
NCOR : Corépresseur des récepteurs nucléaires
NFKB : Facteur Nucléaire Kappa B
NGFI-B : Facteur de croissance Nerveuse Induit B
NT-3 : Neurotrophine 3
PCB : Poly-Chlorés-Biphényles
Pcp2 : Protéine 2 des Cellules de Purkinje
PI3K : Kinase PhosphoInositide-3
Px : x^{ème} jour de vie Post-natale

PPAR : Récepteur Activé par un Proliférateur du Peroxisome
PPRE : Elément de réponse aux PPAR
PR : Récepteur de la Progestérone
PTU : Propyl-Thio-Uracyle
RAR : Récepteur de l'Acide Rétinoïque
RARE : Elément de réponse aux RAR
ROR □ Récepteur Orphelin apparenté au récepteur des Rétinoïdes
RORE : Elément de réponse à ROR
RXR : Récepteur X des rétinoïdes
RC3 : Neurogranine
SHH : Sonic Hedgehog
SMRT : Médiateur atténuateur de RAR et TR
T2 : 3,5-diiodo-L-thyronine
T3 : 3, 5, 3' triiodothyronine
T4 : 3, 5, 3', 5' tétraiodothyronine ou thyroxine
T1AM : 3-iodothyronamine
TH / bZIP □ Leucine ZIPper basique induite par l'Hormone Thyroïdienne
TR □ Récepteur de l'hormone Thyroïdienne
TR2 □ Récepteur Testiculaire 2
TR α^{AM} □ TR Alpha Muté Inductible
TRH □ Facteur de Relargage de la thyrotropine
TSH □ Hormone Stimulant la Thyroïde ou thyrotropine
TSHR □ Récepteur de la TSH
TTF2 □ Facteur de Transcription de la Thyroïde 2
v-ERBA □ Oncogène du virus de la leucémie érythroblastique aviaire

RESUME

Chez l'homme, un déficit congénital d'hormone thyroïdienne (T3) provoque un syndrome appelé crétinisme, caractérisé par un retard mental sévère. Durant le développement post-natal chez la souris, il existe un pic de T3 nécessaire à la maturation de nombreux organes, dont le système nerveux, l'os, le cœur et l'intestin. T3 agit par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, les TR (Récepteurs Thyroïdiens), qui sont des facteurs de transcription pour lesquels le simple ajout du ligand, la T3, permet de basculer de la répression à l'activation de la transcription des gènes-cibles. Les TR présentent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison à T3. Dans le promoteur des gènes-cibles, TR se fixe sur des éléments de réponse appelés *TRE*, généralement à l'état d'hétérodimère avec un autre récepteur appelé RXR. En absence de T3, TR est sous la forme aporécepteur. Le dimère TR / RXR interagit alors avec des corépresseurs à activité histone déacétylase et il réprime la transcription des gènes-cibles. Lorsque T3 se lie à TR, le récepteur change de conformation, il interagit avec des coactivateurs à activité histone acétylase et il active la transcription des gènes-cibles. Chez la souris, deux gènes, *THRA* et *THRB*, codent pour trois TR fonctionnels : TR α 1, TR β 1 et TR β 2.

L'analyse phénotypique de souris invalidées pour une ou plusieurs isoformes de TR a montré que les gènes-cibles régulés par T3 ne sont pas les mêmes selon l'organe et la période de développement. Par une approche combinée d'analyse du transcriptome, de prédiction informatique et de cultures primaires de neuroblastes, nous avons identifié de nouveaux gènes-cibles dans le cervelet post-natal, dont la régulation a été confirmée par PCR quantitative. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont prouvé que certains d'entre eux étaient des gènes directement régulés par la fixation de TR sur un TRE présent dans leur promoteur.

L'hormone thyroïdienne active la transcription de gènes-cibles spécifiques dans un tissu donné, à un moment donné, car son action est modulée par des interactions spécifiques et dynamiques entre un élément de réponse TRE, une isoforme de TR et un grand nombre de cofacteurs. Les cofacteurs intègrent des signaux cellulaires multiples pour permettre une régulation combinatoire de l'expression des gènes-cibles. L'activité des TR n'est donc pas uniquement contrôlée par la liaison du ligand, ce qui empêche de prédire où et quand la

signalisation de T3 sera active. En utilisant des souris transgéniques qui possèdent un système rapporteur pour l'activité de T3, nous avons montré que l'hormone thyroïdienne maternelle est active précocement sur le développement du cerveau embryonnaire. De plus, elle a une activité extrêmement hétérogène dans le système nerveux pré et post-natal, en partie en raison d'un métabolisme spécifique de l'hormone dans le cerveau.

Afin de comprendre quelles sont les actions directes et indirectes de T3 sur un type de cellules nerveuses, il était nécessaire de générer un nouveau modèle, permettant de supprimer la réponse à T3 dans un type cellulaire donné, à un moment donné. TR α 1 est le récepteur majoritairement exprimé dans le cerveau. Il a été décidé de muter et non d'invalider le récepteur, car les souris *TR α 1^{-/-}* ne présentent pas le phénotype cérébelleux caractéristique de l'hypothyroïdie, à savoir une persistance anormale de la couche granulaire externe (CGE) 21 jours après la naissance et une réduction de l'arborisation des cellules de Purkinje. Ce phénotype résulte en fait de l'action délétère exercée par TR α 1 en absence de ligand, car, comme nous l'avons mentionné, l'aporécepteur réprime l'expression des gènes-cibles. Certaines mutations de TR α 1 transforment le récepteur en aporécepteur constitutif. L'objectif essentiel de ma thèse a donc été de construire un modèle de souris exprimant de façon conditionnelle un récepteur TR α 1 muté.

La mutation TR α 1L400R, qui abolit les interactions avec les coactivateurs, a un effet dominant négatif. Cette mutation a été introduite par recombinaison homologe dans le locus de *THRA* et son expression est contrôlée par le système CRE/*loxP*. Lorsqu'il est exprimé depuis le début du développement embryonnaire, TR α 1L400R induit un retard de croissance et de maturation post-natale de différents organes dont l'os et le cœur. Dans le cervelet, la CGE persiste à P21 et l'arborisation des cellules de Purkinje est réduite. L'abolition des interactions entre TR α 1 et les coactivateurs récapitule donc en grande partie des anomalies observées lors d'hypothyroïdie congénitale ou adulte. Le modèle généré devrait permettre de disséquer les actions directes et indirectes de T3 tout au long du développement.

Nos travaux ont également montré que les aporécepteurs TR exercent des actions physiologiques au cours du développement □ d'une part leur présence a été détectée dans le cerveau en développement, grâce au système rapporteur pour l'activité de T3 □ d'autre part

nous avons contribué à démontrer que l'aporécepteur TR α est impliqué dans le développement embryonnaire du cœur.

INTRODUCTION

I. Effets physiologiques de l'hormone thyroïdienne

A. Présentation de l'hormone thyroïdienne

a. Une hormone produite de façon très contrôlée

La forme active de l'hormone thyroïdienne est la 3, 5, 3' triiodothyronine ou T3. Elle est produite par la glande thyroïde, essentiellement sous la forme d'un précurseur : la 3, 5, 3', 5' tétraiodothyronine ou T4 (figure 1).

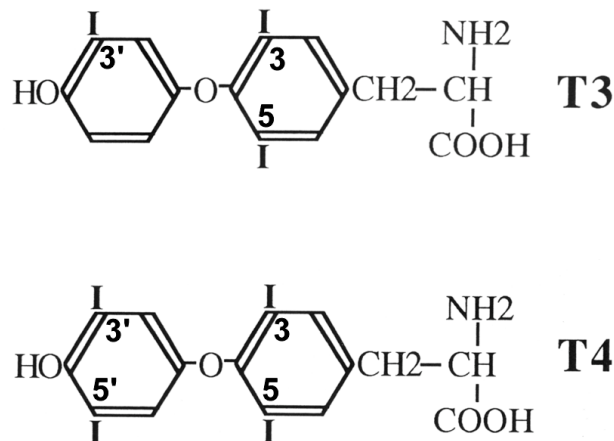


Figure 1 : Structure chimique

- de l'hormone thyroïdienne la 3, 5, 3' triiodothyronine ou T3
- de son précurseur: la 3, 5, 3', 5' tétraiodothyronine ou thyroxine ou T4

La thyroïde est une glande endocrine bilobée, située sur la face ventrale du larynx, constituée de deux types de cellules sécrétrices : les cellules à calcitonine et les cellules folliculaires ou thyrocytes, qui secrètent l'hormone thyroïdienne. Les thyrocytes accumulent activement l'iode d'origine alimentaire. Ils produisent une macromolécule, la thyroglobuline,

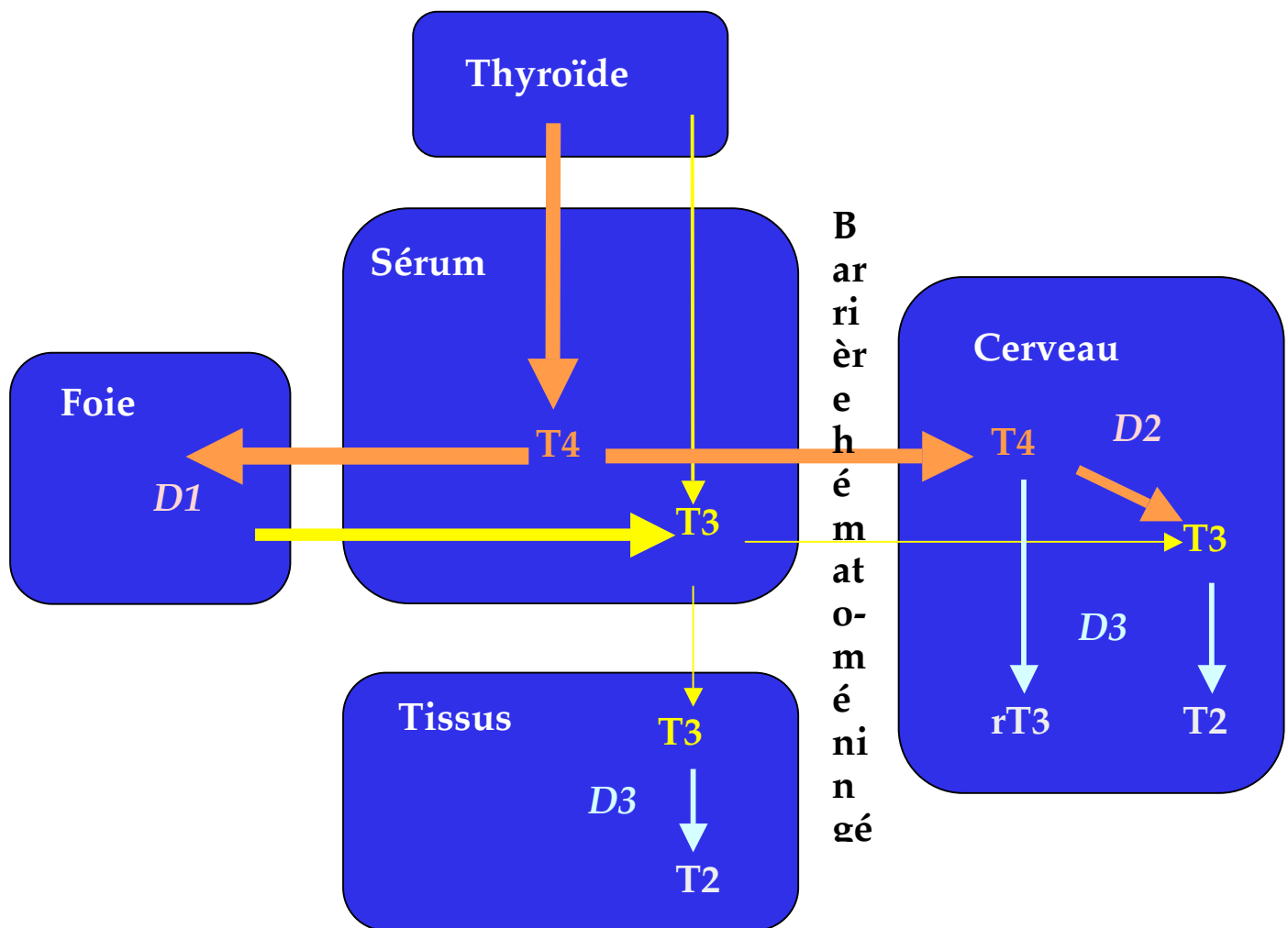


Figure 2 : Métabolisme de l'hormone thyroïdienne

La glande thyroïde libère essentiellement de la 3, 5, 3', 5' tétraiodothyronine (T4), et une faible quantité de 3, 5, 3' triiodothyronine (T3) dans la circulation sanguine. 80 % de la T3 circulante est produite dans les tissus périphériques, par déiodation en 5' de la T4, majoritairement par la DEIODASE 1 (D1) dans le foie. La T3 circulante pénètre dans les tissus, sauf dans le cerveau car la barrière hémato-méningée est relativement imperméable à la T3. La T4 franchit cette barrière, et elle est déiodée en T3 par la DEIODASE 2 (D2), une enzyme exprimée seulement dans le système nerveux, l'hypophyse, le tissu adipeux brun et le placenta. Dans tous les tissus, la T4 et la T3 sont dégradées en dérivés triiodés (rT3) ou diiodés (T2) par la DEIODASE 3 (D3).

dont les résidus tyrosines sont iodés par l'enzyme THYROPEROXYDASE, avant son stockage dans la lumière des follicules où elle forme le colloïde. Elle est ensuite réinternalisée dans les thyrocytes par endocytose. Dans les lysosomes, la protéolyse de la thyroglobuline iodée aboutit à la libération de 3, 5, 3', 5' tétraiodothyronine ou T4 essentiellement, et d'une faible quantité de 3, 5, 3' triiodothyronine ou T3 dans la circulation sanguine (Laurberg, 1984). Chez l'homme, la glande thyroïde est fonctionnelle dès 10-12 semaines de vie embryonnaire et il existe un pic de sécrétion de T4 entre 18 et 20 semaines de vie post-natale. Chez les souris, qui naissent très immatures, le pic de T4 se situe entre la première et la troisième semaine de vie post-natale. A P15 (15 jours de vie post-natale), le niveau de T3 dans le sang est 2000 fois plus élevé qu'à la naissance (Hadj-Sahraoui et al., 2000) puis il diminue pour rester à un niveau constant pendant la vie adulte.

Dans le sang, la proportion de T4 libre est très faible (0,02 %). La majorité de la T4 circule liée à des protéines plasmatiques, essentiellement la THYROXINE BINDING GLOBULINE (68 %), la TRANSTHYRÉTINE (11 %) et l'ALBUMINE (20%). 80 % de la T3 circulante est produite dans les tissus périphériques, par déiodation en 5' de la T4, majoritairement dans le foie par la DEIODASE ou D1. La T3 circulante pénètre dans les tissus, à l'exception du cerveau car la barrière hémato-méningée est relativement imperméable à la T3. La T4 franchit cette barrière, et elle est également transportée du sang dans le liquide céphalo-rachidien, via les plexus choroïdes. La D1 n'étant pas exprimée dans le cerveau (Thompson and Potter, 2000), T4 est alors convertie en T3 par la DEIODASE 2 ou D2, une enzyme exprimée seulement dans le système nerveux, l'hypophyse, le tissu adipeux brun et le placenta (Guadano-Ferraz et al., 1999). Dans tous les tissus, la T4 et la T3 sont dégradées en dérivés diiodés ou monoiodés notamment par la DEIODASE 3 ou D3 (figure 2) (Kaplan, 1984).

La synthèse de l'hormone thyroïdienne est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire (figure 3). La synthèse de T4 dans la thyroïde est activée par l'hormone hypophysaire TSH (Thyroid Stimulating Hormone) (Shupnik et al., 1985). La production de TSH est elle-même stimulée par la TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) d'origine hypothalamique (Koller et al., 1987). De plus, la T4 et la T3 circulantes exercent un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse en réprimant l'expression des gènes codant pour

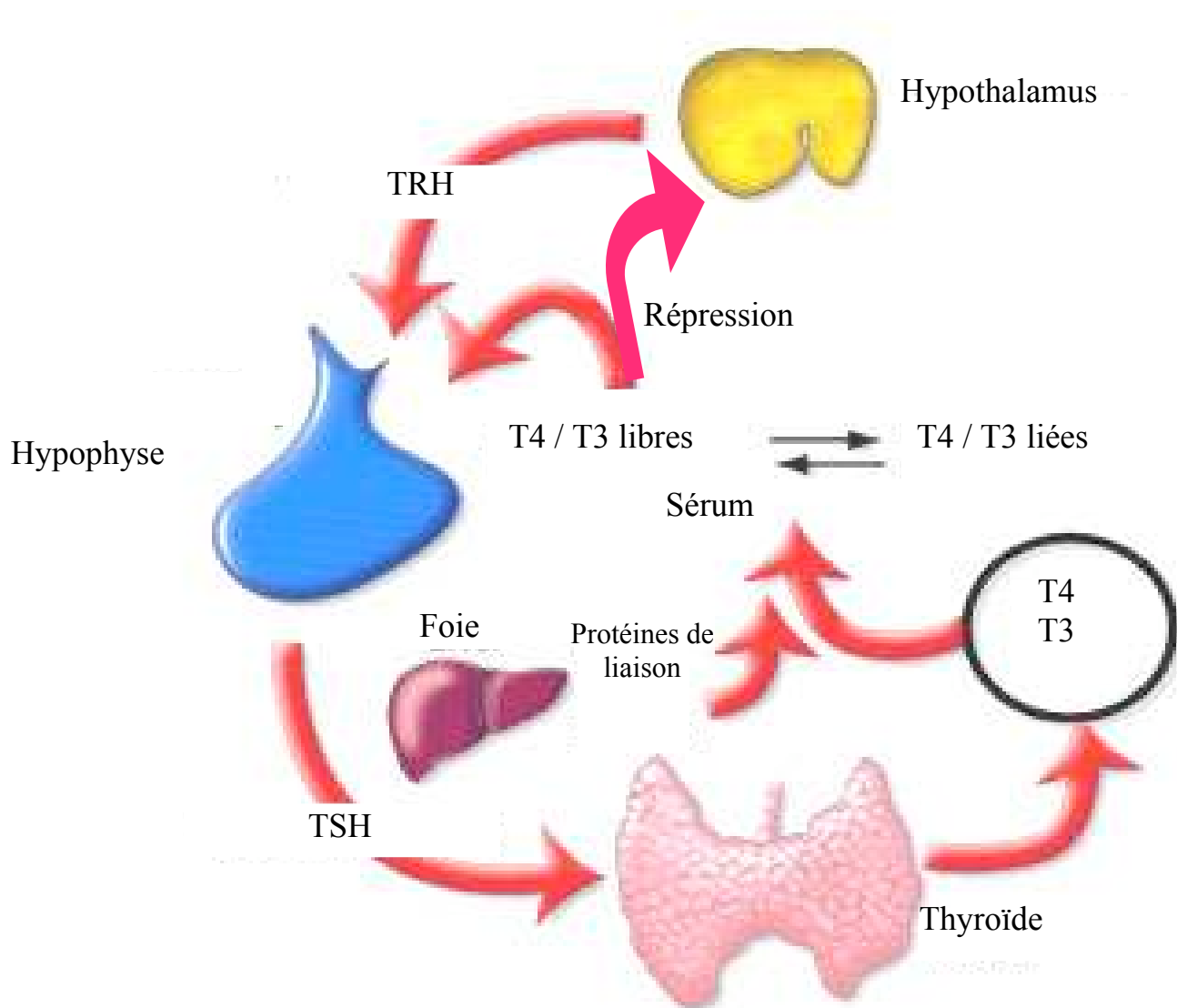


Figure 3 : Régulation de la production de l'hormone thyroïdienne par l'axe hypothalamo-hypophysaire

Les cellules folliculaires de la thyroïde secrètent essentiellement de la thyroxine (T4) dans la circulation. La déiodation périphérique de cette molécule, principalement au niveau du foie, assure la synthèse périphérique de l'hormone thyroïdienne T3, qui est la forme biologiquement active. Dans le sérum T4 et T3 sont liées à des protéines de transport ou libres. La production de la T4 est activée par la TSH hypophysaire, elle-même activée par la TRH hypothalamique. La T3 exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse en réprimant l'expression des gènes codant pour la TRH dans l'hypothalamus (Koller et al., 1987) et la TSH dans l'hypophyse (Shupnik et al., 1985).

les deux sous-unités de la TSH, $TSH\alpha$ et $TSH\beta$, ainsi que du gène codant pour la TRH. Le niveau d'hormone thyroïdienne dans le sérum est donc étroitement régulé.

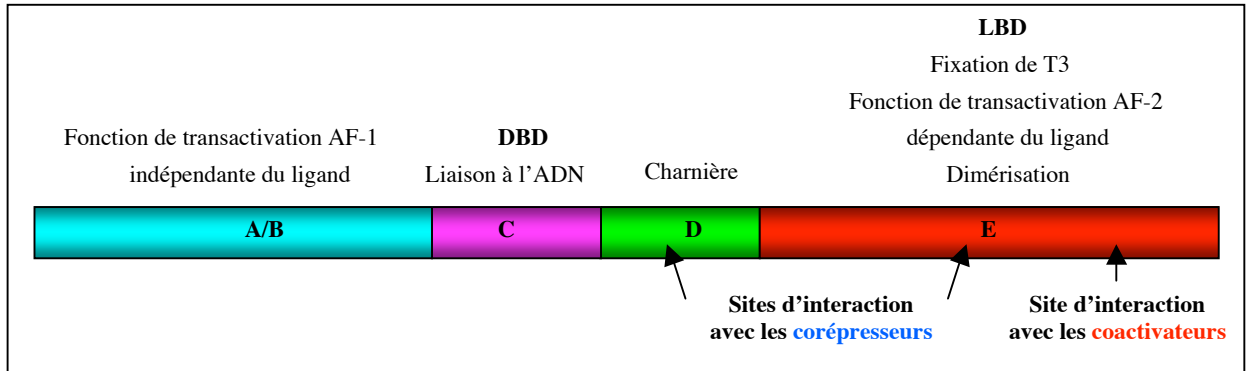
b. Mode d'action moléculaire : les récepteurs de l'hormone thyroïdienne

La question du mode d'action moléculaire de l'hormone thyroïdienne demeure ouverte—dans le modèle classique elle agit directement dans le noyau, cet effet est qualifié de génomique. Or elle peut également agir selon diverses voies cytoplasmiques, ces effets sont qualifiés de non génomiques.

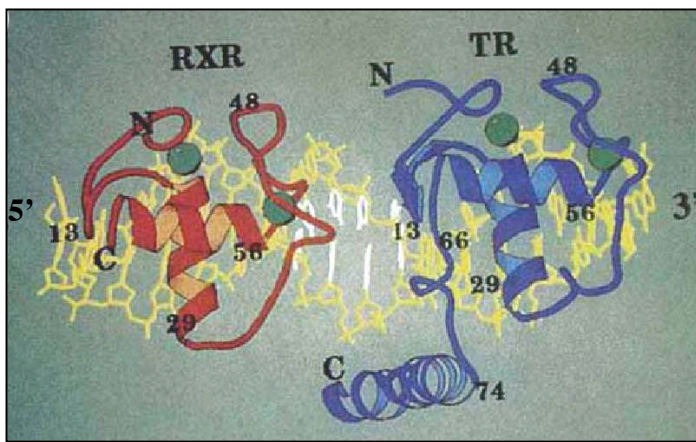
1. Régulation transcriptionnelle dépendante du ligand

Dans le modèle d'action génomique, T3 régule directement la transcription de gènes-cibles *via* des récepteurs nucléaires appelés récepteurs à l'hormone thyroïdienne ou TR. Les TR sont des facteurs de transcription qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison du ligand (LBD), dans lequel T3 se fixe (figure 4). Acollé au LBD, il existe également un domaine de transactivation dépendante du ligand, appelé AF-2 (Fonction d'activation 2). TR se fixe sur des éléments de réponse appelée *TRE* (*Thyroid Response Element*) dans le promoteur des gènes-cibles, le plus souvent à l'état d'hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire, RXR. En absence de T3, TR est sous la forme aporécepteur, il interagit avec des corépresseurs et il réprime la transcription des gènes-cibles. Lorsque TR est lié à T3, il change de conformation tridimensionnelle pour prendre la forme holorécepteur. L'hélice 12, qui constitue la partie centrale du domaine de transactivation AF-2, se replie sur le récepteur. TR interagit alors avec des coactivateurs et le gène est activement transcrit (figure 5) (Wagner et al., 1995). Il est remarquable que le changement complet du répertoire d'interactions protéiques ne semble provenir que du changement de position de l'hélice 12, qui, en présence de T3, se replie sur la surface formée par les hélices 3,4 et 5 du domaine de fixation au ligand (Marimuthu et al., 2002).

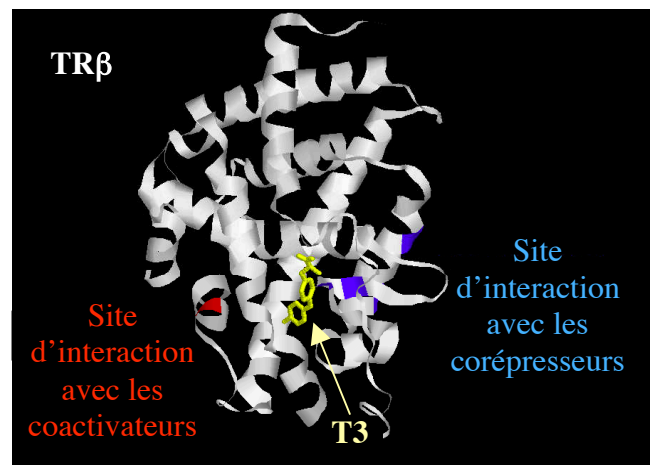
A.



B.



C.



D.

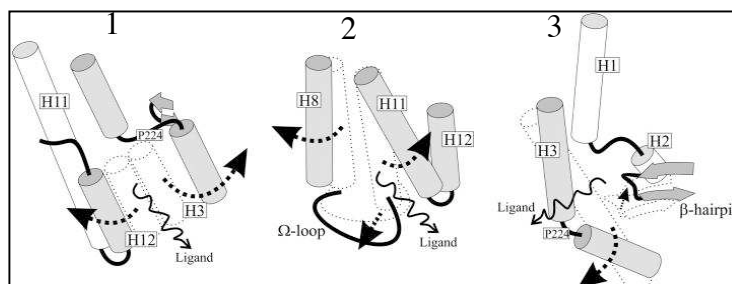


Figure 4 : Structure des TR

A. Le récepteur de l'hormone thyroïdienne TR est composé de quatre domaines, dont un domaine C qui lie l'ADN (DBD) et un domaine E qui lie T3 (LBD). Les sites d'interaction TR / cofacteurs se situent essentiellement dans le LBD.

B. Cristallographie du complexe TR / RXR sur un *DR4* (Rastinejad et al., 1995).

C. Sur cette représentation tridimensionnelle de TRβ, le sillon amphipathique où se fixent les coactivateurs est visible, ainsi que le sillon hydrophobe où se fixent les corépresseurs (d'après http://www.msg.ucsf.edu/flett/PDB_files.html).

D. Des simulations moléculaires dynamiques montrent que la dissociation de T3 du récepteur TRα1 peut se réaliser de trois façons différentes : 1, 2, 3 (Martinez et al., 2005).

Certains gènes-cibles de T3 sont régulés de façon inverse, c'est-à-dire que leur expression est activée en absence de T3 et réprimée en présence de T3. C'est le cas par exemple des gènes *TSHα* et *TSHβ* codant pour les sous-unités de la TSH (Shupnik et al., 1983).

L'hétérodimère TR / RXR est considéré non permissif, c'est-à-dire non régulé par les ligands de RXR. Une exception existe : l'activation de l'expression de la prolactine par TR / T3 est inhibée par l'acide rétinoïque 9 cis, un ligand de RXR (Li et al., 2004 ; Castillo et al., 2004). Cependant, comme l'existence de ligands physiologiques de RXR actifs *in vivo* reste spéculative (Desvergne, 2007), leur implication sur la régulation de gènes-cibles endogènes reste à déterminer.

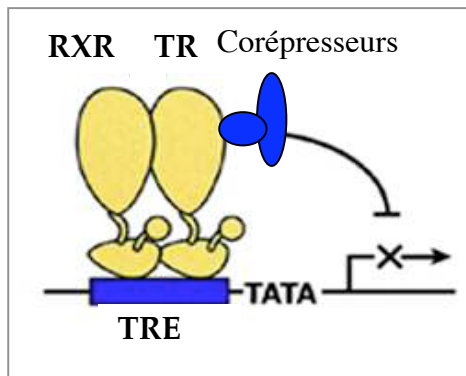
Deux critères définissent donc un gène-cible (direct) de T3 : une expression régulée par l'hormone et la présence dans le gène d'un *TRE* sur lequel TR se fixe. Les éléments de réponse *TRE* sont une répétition plus ou moins dégénérée de la séquence AGGTCA, soit espacée de 4 nucléotides (*DR4*), soit inversée et espacée de 6 nucléotides (*ER6*). *In vitro*, des monomères ou des homodimères TRβ sont capables de se fixer sur un *IR0*, une répétition inversée du motif, ou sur un *IP6*, un palindrome inversé espacé de 6 nucléotides, et d'activer l'expression d'un gène rapporteur en réponse à T3 (Velasco et al., 2007). Cependant, à ce jour il n'a pas été démontré qu'ils constituaient des *TRE* fonctionnels *in vivo*.

En plus de son action sur les gènes-cibles, TR peut agir de façon plus large sur l'expression des gènes. La protéine à doigt de zinc CTCF neutralise les enhancers pour éviter leurs effets illégitimes. Or les sites de liaison de CTCF sont souvent flanqués de *TRE*, par exemple dans le silencer situé en amont du gène codant pour le lysozyme de poulet ou le c-myc humain. L'addition de T3 abroge l'effet de neutralisation des enhancers, alors que CTCF est toujours fixé sur la chromatine (Lutz et al., 2003). Cependant, nous ne développerons pas cette action de TR, car elle est encore mal connue.

2. Les récepteurs nucléaires de l'hormone thyroïdienne

Deux gènes, *THRA* et *THRB*, codent pour neuf isoformes de TR chez la souris (Flamant et al., 2006b ; Casas et al., 2006) (figure 6 et 7), dont trois sont des récepteurs fonctionnels : TRα1, TRβ1, TRβ2, l'isoforme TRβ3 et son homologue tronquée TRΔβ3 étant spécifiques du rat (Williams, 2000 ; Harvey et al., 2007). Les récepteurs TRβ sont notamment

A. Transrepression en absence de T3



B. Transactivation en présence de T3

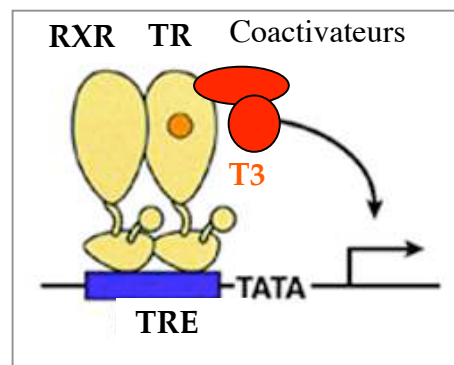
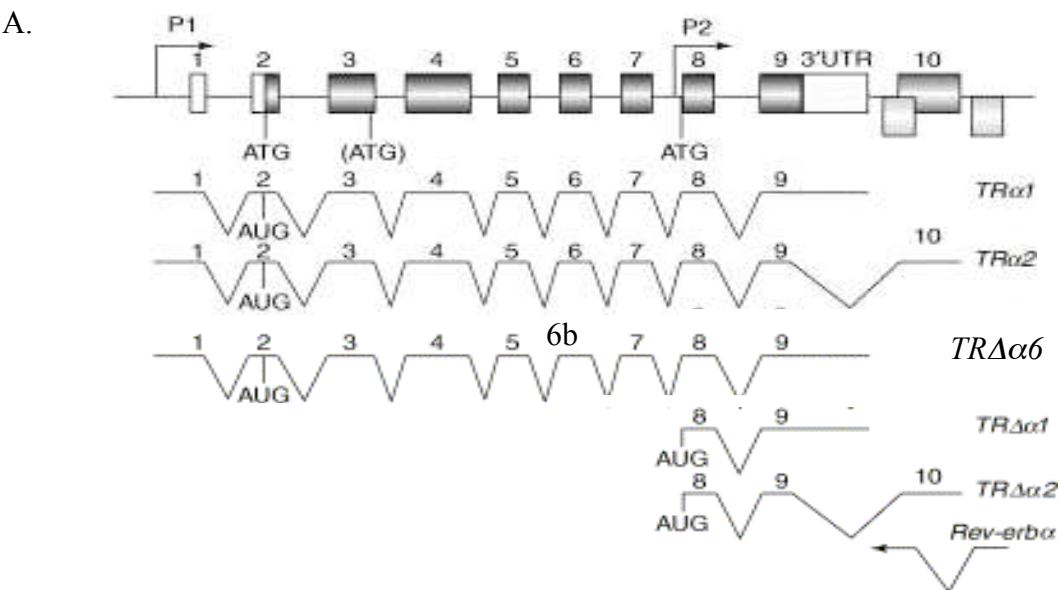


Figure 5 : L'hormone thyroïdienne T3 régule la transcription de gènes cibles
(d'après Glass et al., 2000)

L'hormone thyroïdienne T3 régule la transcription de gènes cibles *via* des récepteurs nucléaires appelés TR. TR se fixe dans le promoteur du gène cible, sur des éléments de réponse appelés TRE, le plus souvent à l'état d'hétérodimère avec le récepteur RXR. En absence de T3, TR interagit avec des corépresseurs et il réprime l'expression du gène cible (A). En présence de T3, TR interagit avec des coactivateurs et il active l'expression du gène cible (B).



B.

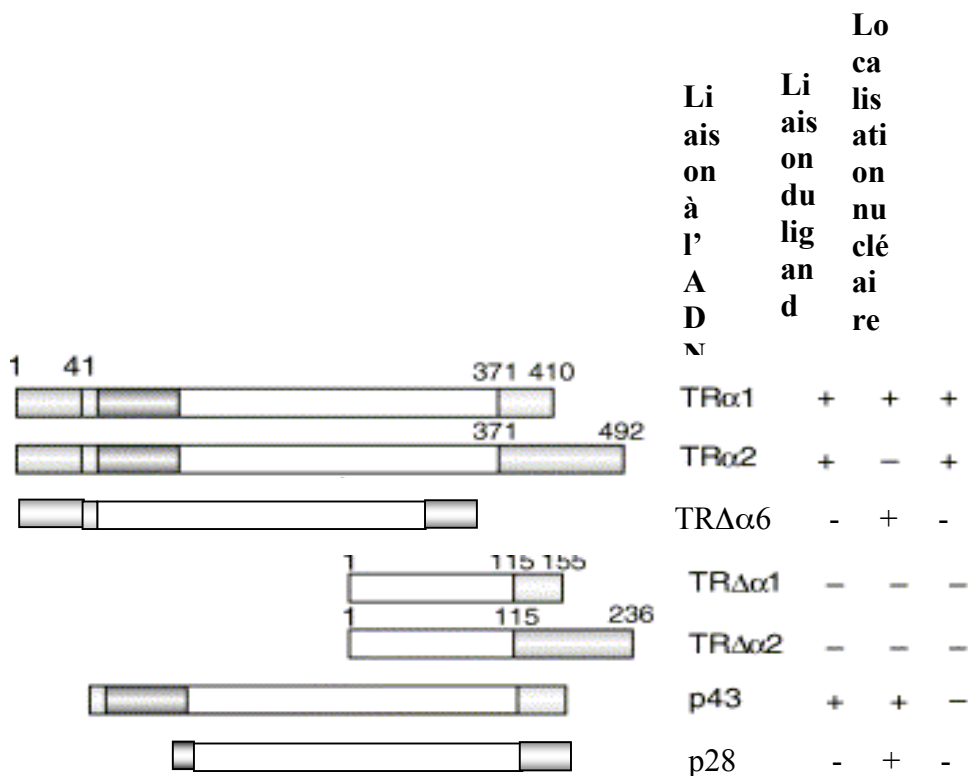
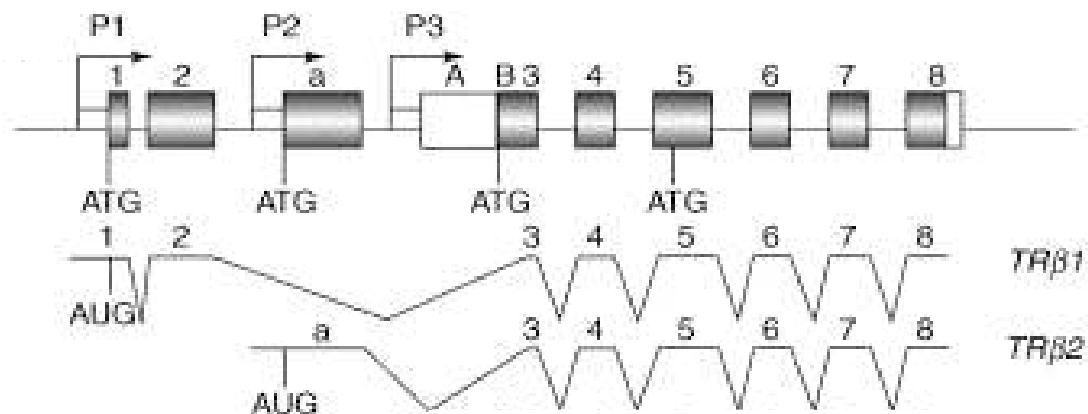


Figure 6 : Le gène *THRA* code pour sept isoformes chez la souris
(adapté de Flamant and Samarut, 2003)

A partir du locus de *THRA*, cinq ARNm différents sont générés par épissage alternatif de l'exon 6 et 9, et utilisation d'un promoteur interne P2 (A). Ces transcrits codent pour sept protéines différentes, par traduction à partir d'ATG alternatifs (B).



		Li ais on à l' A D N	Li ais on du lig and	Lo cal isa tio n nu clé air e	
93	461				
107	475	TRβ1	+	+	+
24		TRβ2	+	+	+

Figure 7 : Le gène *THRB* code pour deux isoformes chez la souris
(Flamant and Samarut, 2003)

A partir du locus de *THRB*, deux ARNm différents sont générés à partir de deux promoteurs (A), il codent pour les récepteurs TRβ1 et TRβ2 (B).

impliqués dans le rétrocontrôle négatif exercé par T3 et T4 sur l'expression de *TSHα* et *TSHβ* (Forrest et al., 1996). L'isoforme TRα2, produite par épissage alternatif, diffère de TRα1 dans sa partie C-terminale, ce qui la rend incapable d'interagir avec T3 et la prive de fonction transactivatrice AF2. Coexprimée avec TRα1, elle aurait une action dominante négative (Burgos-Trinidad and Koenig, 1999 □ Lazar et al., 1989), mais son rôle physiologique demeure mal connu. Les isoformes tronquées TRΔα1 et TRΔα2, produites à partir d'un promoteur interne, n'ont pas de domaine de fixation à l'ADN. Dans des expériences d'expression transitoire, elles inhibent l'action de TRα1 (Chassande et al., 1997). Récemment une autre isoforme à rôle antagoniste, produite par épissage alternatif, a été identifiée □ TRΔα6. Elle ne lie pas l'ADN (Casas et al., 2006). Enfin, deux protéines à localisation mitochondriale sont codées par *THRA* □ p28 et p43, par traduction de l'ARN de TRα1 à partir de codons initiateurs internes. Seule la p43 possède un domaine de liaison à l'ADN, elle régulerait la transcription du génome mitochondrial (Casas et al., 1999).

Ces isoformes ont des patrons d'expression spécifiques (Shahrara et al., 1999). L'expression de *THRA* est pratiquement ubiquitaire, TRα1 et TRα2 sont notamment fortement exprimés dans le cerveau et le cœur. L'expression de *THRB* est plus restreinte. TRβ1 est l'isoforme prédominante dans le foie, tandis que TRβ2 est majoritaire dans l'oreille interne, l'hypothalamus et la rétine. Les TR sont exprimés de façon précoce au cours du développement embryonnaire : TRα1 est exprimé dès la dixième semaine de gestation chez l'homme (Bernal and Pekonen, 1984) et dès E14,5 (14,5 jours de vie embryonnaire) dans le cerveau fœtal du rat (Morreale de Escobar et al., 1985).

3. Effets non génomiques de T3

Certaines des actions de T3 ne rentrent pas dans le modèle classique, ce sont les actions non génomiques. Elles peuvent être définies ainsi □ ce sont des effets de T4, T3 ou de leurs métabolites, généralement rapides, qui peuvent impliquer TR mais dans lesquels l'expression des gènes-cibles n'est pas activée par le complexe TR / T3 fixé sur un *TRE*. Il s'agit d'une définition négative car il existe toutes sortes de mécanismes non génomiques, développés ultérieurement (cf. II. E. b). En raison de l'excellente corrélation entre l'activité biologique des dérivés iodés (T4, T3, reverse T3 etc....) et la mesure de

leur affinité pour les TR, la plupart des études ont cependant été consacrées à la voie génomique.

c. Un déficit d'hormone thyroïdienne conduit à une pathologie sévère

1. Tableau clinique

Un déficit d'hormone pendant la période néonatale a des conséquences extrêmement sévères, il est à l'origine du « crétinisme ». Ce syndrome touche un enfant sur 3000 ou 4000 (Macchia et al., 1999). Chez le nouveau-né, les symptômes classiques de l'hypothyroïdie sont : jaunisse, difficultés à la tétée, cri rauque, léthargie, hypothermie, hypotonie, abdomen distendu et peau tachetée. Avec le temps, peuvent également apparaître une macroglossie, une hernie ombilicale et des fontanelles apparentes. Si la maladie est diagnostiquée et traitée dès la naissance, la croissance et le développement mental de l'enfant sont normaux. Sinon, les patients souffrent à l'âge adulte de déficiences physiques et mentales graves : arriération mentale, nanisme, persistance de caractères infantiles, surdité, mauvaise vision, peau sèche et épaisse, langue proéminente, faiblesse musculaire, léthargie grave et fatigue (Legrand 1986). Sur le plan neurologique, l'hypothyroïdie néonatale entraîne une ataxie cérébelleuse et des anomalies cognitives : troubles de la mémoire, hallucinations, confusions et comportement psychotique (Smith et al., 2002). La présence d'un goitre, c'est-à-dire une hypertrophie de la thyroïde, révèle une stimulation anormale de cette glande par la TSH, en réponse à la concentration réduite de T3 et de T4 dans le sang.

L'apparition d'une hypothyroïdie à l'âge adulte est moins délétère mais davantage répandue (2% de la population). Un ralentissement du métabolisme est observé. Le patient n'a pas d'appétit, ne supporte pas le froid, a la peau sèche et rugueuse, les cheveux cassants, la voix rauque, il se fatigue vite, souffre de constipation et de faiblesse musculaire. L'examen clinique peut révéler les symptômes suivants : peau sèche, écailleuse, froide et pâle, épaissement de la peau et des tissus sous-cutanés (myxœdème), ralentissement des réflexes et des pulsations cardiaques, parfois un déficit de mémorisation (Legrand 1986).

2. Etiologie

Chez le nouveau-né, la cause principale d'hypothyroïdie est une carence en iode au cours de la grossesse. Les régions d'endémies sévères ont été progressivement réduites, mais 200 millions de personnes sont encore exposées (Vanderpas, 2006). Dans les régions où l'iode ne fait pas défaut, l'hypothyroïdie congénitale est d'origine héréditaire. Il existe diverses anomalies génétiques de l'hormonosynthèse (Carranza et al., 2006) : des mutations dans les gènes impliqués dans l'organogenèse de la thyroïde (gènes codant pour TTF2 ou PAX8), la synthèse de l'hormone thyroïdienne (gènes codant pour la thyroglobuline, l'enzyme thyroperoxydase, le transporteur de l'iode, la protéine DUOX2 impliquée dans l'organification de l'iode (Varela et al., 2006)), ou la synthèse de TRH ou TSH (Macchia et al., 1999).

Les adolescents et les adultes hypothyroïdiens sont le plus souvent atteints de thyroïdite chronique. La plus fréquente, celle d'Hashimoto, touche principalement les adolescents (1,2% de la population d'âge scolaire), en particulier du sexe féminin (2 filles pour 1 garçon). Cette maladie auto-immune est due à la production d'anticorps anti-thyroperoxydase, ou parfois d'anticorps anti-thyroglobuline, qui détruisent le tissu thyroïdien.

3. Traitement

L'hypothyroïdie se traite par l'administration quotidienne de comprimés de T4 synthétique, dont la demi-vie est assez longue (de 7 à 9 jours). Le dosage sérique de la T3 et de la T4 libres et totales, ainsi que de la TSH, sont indispensables pour déterminer la posologie adéquate. Chez les nouveau-nés hypothyroïdiens, l'administration de T4 pendant les deux premières années de vie post-natale prévient les anomalies d'histogénèse cérébrale. Le QI ultime est notablement plus élevé chez les enfants dont l'hypothyroïdie a été décelée et traitée avant l'âge de 6 semaines, par rapport à ceux dont l'hypothyroïdie n'a pas été traitée durant les 6 à 12 premières semaines de vie. C'est pourquoi les nouveaux-nés sont soumis à un dosage de l'hormone thyroïdienne T3 et de son précurseur T4, qui doit être réalisé de préférence dans les 24 heures après la naissance (Buyukgebiz, 2006).

B. Intérêt d'étudier les récepteurs de l'hormone thyroïdienne

a. L'hypothyroïdie, un problème actuel de santé publique

Bien que l'hypothyroïdie néonatale soit dépistée et traitée, trois problèmes restent non résolus :

1. Les hypothyroïdies modérées et les hypothyroïdies fonctionnelles sont difficiles à diagnostiquer et à traiter.
2. L'hypothyroïdie fœtale, encore très mal connue et non dépistée, pourrait avoir des conséquences sévères sur le développement du cerveau.
3. Certains polluants de l'environnement perturbent la fonction thyroïdienne.

1. Hypothyroïdies modérées et fonctionnelles

Récemment, Pedraza et al. (Pedraza et al., 2006) ont montré chez le rat que le dosage de T3 et de T4 dans le sang n'est pas un bon indicateur d'hypothyroïdie. Lorsqu'il existe une déficience iodée, quel que soit son grade le niveau de T3 est simultanément élevé, normal ou faible selon les tissus. Un déficit iodé modéré, qui entraîne une diminution du niveau de T4 sans affecter le niveau de T3, peut affecter les capacités mentales et le neuro-développement dans les populations occidentales. En l'absence de signes cliniques d'hypothyroïdie et de diminution du niveau de T3 dans le sérum, le dépistage est particulièrement difficile.

L'hypothyroïdie fonctionnelle désigne des pathologies dans lesquelles des symptômes d'hypothyroïdie sont présents en dépit d'une concentration sérique de T3 normale ou modérément élevée. 122 mutations différentes dans le gène *THRB* ont été à ce jour identifiées comme responsables à l'état hétérozygote d'un syndrome de Résistance à l'Hormone Thyroïdienne (RTH) (Olateju and Vanderpump, 2006). TR β étant impliqué dans le mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par T3 sur sa propre production, une mutation de ce récepteur est responsable d'un taux de TSH élevé, qui entraîne un taux de T3 et T4 normal ou modérément élevé dans le sérum des patients atteints de RTH, alors qu'ils présentent certains signes cliniques d'hypothyroïdie. Les symptômes sont très variables, car l'insensibilité des organes cibles de T3 est plus ou moins étendue selon les individus. Ils peuvent être caractéristiques de l'hypothyroïdie : retard de croissance, troubles

neurophysiologiques, surdité ou bien caractéristiques de l'hyperthyroïdie : hyperactivité, tachycardie. En effet, le myocarde exprime essentiellement le récepteur TR , fonctionnel chez les patients atteints de RTH, qui est activé lorsque la concentration de T3 est élevée. A l'heure actuelle il n'existe pas de traitement approprié pour les patients souffrant de RTH.

Notons qu'à ce jour, aucune mutation de *THRA* n'a encore été identifiée chez des patients hypothyroïdiens. Le phénotype des souris possédant de telles mutations (Tinnikov et al., 2002  Liu et al., 2003  Kaneshige et al., 2001a) suggère qu'elles sont soit létales chez l'homme, soit responsables d'un tableau clinique trop sévère pour être facilement diagnostiqué comme de l'hypothyroïdie, d'autant plus que les niveaux sériques de T3 et T4 ne doivent pas être modifiés.

2. Hypothyroïdie foetale

L'hypothyroïdie n'est diagnostiquée qu'après la naissance, or l'hormone thyroïdienne est nécessaire au développement cérébral du fœtus. Bien que la thyroïde fœtale ne soit fonctionnelle qu'à partir de 10-12 semaines de vie embryonnaire, la T4 maternelle est capable de franchir la barrière placentaire (Obregon et al., 1984). Pendant la gestation, un taux faible de T4 chez la mère augmente le risque de déficit neurodéveloppemental du fœtus: les migrations cellulaires sont perturbées, ce qui modifie la cytoarchitecture du cortex somatosensoriel et de l'hippocampe (Lavado-Autric et al., 2003). Comme une diminution du niveau de T4 n'entraîne pas nécessairement de symptômes cliniques chez la mère, les hypothyroïdies fœtales ne sont ni détectées ni traitées. Chez les enfants prématurés, il existe une association entre une hypothyroxin mie transitoire et un neuro-développement anormal pendant la première semaine de vie post-natale. Cependant l'administration prophylactique d'hormone thyroïdienne ne réduit ni la mortalité, ni la morbidité néonatales et n'améliore pas le neuro-développement (Osborn and Hunt, 2007).

3. Perturbateurs thyroïdiens

Loin d'être une maladie marginale, l'hypothyroïdie menace l'ensemble de la population occidentale. En effet, certains polluants chimiques présents dans l'environnement et l'alimentation perturbent la fonction thyroïdienne. Bien que leurs effets sur la signalisation

des oestrogènes soient prépondérants (Nakanishi, 2007), divers xénobiotiques interfèrent avec la signalisation T3 / TR (Zoeller, 2005). Des pathologies transgénérationnelles sont à craindre car la vinclozine, un composé anti-androgénique, peut induire des maladies transmissibles sur quatre générations, *via* une altération du statut épigénétique de la lignée germinale mâle (Anway et al., 2006).

Etant donné l'importance de l'hormone thyroïdienne sur le développement du cerveau foetal, l'exposition *in utero* à des perturbateurs thyroïdiens pourrait entraîner un retard mental. Le bisphénol-A (4,4' isopropylidenediphenol), un catalyseur utilisé dans la synthèse du plastique, interagit chez le rat avec les TR et agit comme un antagoniste *in vitro*. 800 milles tonnes de bisphénol-A sont produits annuellement par les USA. Présent dans le sérum des femmes enceintes, il est 5 fois concentré dans le liquide amniotique (jusqu'à 100 ng/g dans le placenta) et s'accumule dans le fœtus. Chez le rat, l'administration d'une concentration encore plus élevée (1 à 50 µg/g) pendant la gestation et l'allaitement augmente le niveau de T4 chez les petits âgés de 15 jours post-nataux (P15), ce qui entraîne une surexpression de la neurogranine, un gène-cible de T3, dans le gyrus dentelé (Zoeller, 2005). Le bisphénol A peut donc activer anormalement la voie de la T3 dans certaines régions cérébrales, tandis que d'autres xénobiotiques peuvent provoquer l'effet inverse.

Les perturbateurs de la fonction thyroïdienne menacent également l'équilibre écologique, puisque les poissons par exemple sont sensibles à de nombreux xénobiotiques. Le perchlorate est un polluant généré lors de la production d'explosifs ou de batteries, potentiellement présent en faible quantité dans l'eau et dans diverses sources alimentaires (lait, fruit, légumes). Chez le poisson zèbre, l'exposition prolongée au perchlorate diminue le niveau de T4 à la fois chez la mère et chez l'embryon et modifie le sex ratio du côté féminin de façon proportionnelle à sa concentration (Mukhi et al., 2007).

Il convient de déterminer dans quelle mesure la perturbation de la fonction thyroïdienne est responsable des effets toxiques de ces xénobiotiques. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle d'études reliant une éventuelle fixation à haute ou faible affinité d'une de ces molécules sur TR, l'induction d'effets physiologiques ou pathologiques et la détection de cette molécule à des concentrations actives dans des prélèvements humains.

Par exemple, les PCB (Poly-Chlorés Biphényles) sont des polluants ubiquitaires et

persistants de l'environnement, proches des dioxines. Les études épidémiologiques montrent une association entre l'exposition à des PCB au cours du développement, des déficits neuropsychologiques, des déficits moteurs, des troubles d'attention et de mémorisation (Ayotte et al., 2003) et une réduction du niveau de T4 dans le sang (Wang et al., 2005). Il a été montré que les PCB déplacent la T4 des protéines sériques de transport et activent une enzyme du catabolisme, l'UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE (Zoeller et al., 2000). Certains PCB agiraient également comme des agonistes ou des antagonistes des TR. Par exemple, le 4-Hydroxy-PCB106 se fixe sur le TR β 1 humain et l'active *in vitro* dans les cellules GH3, il induit l'expression d'un gène rapporteur (*TRE-Luciférase*) et de GH, un gène-cible endogène, à des concentrations de 10^{-5} M, de façon équivalente à 10^{-7} M de T3. Cependant, le niveau de contamination observé dans la population occidentale, très inférieur à 10^{-5} M, est insuffisant pour activer les TR (You et al., 2006).

Pour détecter les perturbateurs thyroïdiens, un test physiologique a été mis au point chez le Xénope : des têtards transgéniques possédant un gène rapporteur (*TRE-EGFP* ou *TRE-Luciférase*) permettent de visualiser directement l'activation de TR *in vivo*. Grâce à la peau translucide des animaux et à leur petite taille, l'expression du transgène rapporteur fluorescent est directement mesuré dans une plaque de 96 puits. Grâce à ce test, l'acétochlor, un herbicide, a pu être identifié comme un perturbateur thyroïdien à une concentration de 10^{-8} M (Turque et al., 2005).

b. Les récepteurs de l'hormone thyroïdienne sont potentiellement des oncogènes

Historiquement, le récepteur TR α a été identifié par homologie avec la protéine v-ERBA, une protéine oncogénique produite par le virus érythroblastique aviaire (Sap et al., 1986). v-ERBA fonctionne comme un répresseur transcriptionnel constitutif (Lee and Privalsky, 2005) et bloque la différenciation érythrocytaire chez le poulet. Des souris transgéniques exprimant v-ERBA développent des hépatocarcinomes (Barlow et al., 1994), mais le mécanisme d'action moléculaire est encore mal connu. La localisation anormale de v-ERBA dans le cytoplasme conduirait à séquestrer localement TR α et RXR, ses partenaires d'interaction (Bonamy et al., 2005). Un autre mécanisme a été proposé parmi les différences entre v-ERBA et son homologue, le TR α aviaire, la modification de deux acides aminés altère

la dimérisation, ce qui entraîne la formation d'homodimères plus stables, augmente la fixation de corépresseurs et réprime plus fortement les gènes-cibles. Une mutation additionnelle dans le domaine de liaison à T3 rend v-ERBA plus résistant à la dissociation des corépresseurs induite par T3, tandis qu'une troncation terminale permet le recrutement d'un corépresseur supplémentaire, SMRT. De multiples mutations sont donc responsables du caractère oncogénique de v-ERBA (Lee and Privalsky, 2005), ce qui expliquerait que les mutations ponctuelles réalisées dans le gène *THRA* de la souris n'induisent pas de leucémie (Tinnikov et al., 2002; Liu et al., 2003).

Parmi les gènes dont l'expression est affectée chez les souris transgéniques exprimant v-ERBA, il est impossible de distinguer les véritables oncogènes des marqueurs de prolifération. TR α est un outil de choix pour identifier les gènes-cibles car la simple addition de T3 fait basculer le récepteur de la transrepression à la transactivation. Cependant il n'est pas certain que v-ERBA et de TR α aient les mêmes gènes-cibles, car TR α ne bloque pas la différenciation érythrocytaire même lorsqu'il est transformé en répresseur constitutif par mutagenèse ciblée (Kaneshige et al., 2001b; Tinnikov et al., 2002; Liu et al., 2003).

Un seul laboratoire a montré que des récepteurs de l'hormone thyroïdienne mutés sont trouvés dans plus de 70% des carcinomes hépato-cellulaires analysés (Chan and Privalsky, 2006). Alors que des mutations de *THRA* sont identifiées seulement dans des hépatocarcinomes et des carcinomes rénaux, des mutations de *THRB* sont retrouvées dans différents cancers, en particulier les cancers de l'hypophyse, de la thyroïde et du sein (Cheng, 2003). Cette association ne prouve pas que ces mutations sont à l'origine du processus oncogénique. Une seule lignée de souris mutantes pour TR développe spontanément des cancers. Les souris TR $\beta^{PV/PV}$ développent spontanément des carcinomes de la thyroïde, avec une progression pathologique d'hyperplasie, invasion vasculaire et capsulaire et éventuellement métastases aux poumons (Suzuki et al., 2002). Ces souris développent également des cancers de l'hypophyse ou TSHomes (Furumoto et al., 2005). Différents mécanismes seraient impliqués (cf. III. A. c. 3.).

c. Les TR sont des cibles thérapeutiques potentielles

La signalisation de l'hormone thyroïdienne n'est pas seulement source de problèmes médicaux. Les agonistes des TR pourraient servir d'agents pharmaceutiques pour faire maigrir et diminuer le niveau de cholestérol dans le sang. Cependant l'administration de T4 est déconseillée car elle provoque des effets secondaires comme une fonte musculaire, une tachycardie sinusale ainsi que des arythmies atriales qui réduisent la contraction des ventricules cardiaques (Schmidt-Ott and Ascheim, 2006). Des ligands synthétiques, spécifiques d'une isoforme de TR apparaissent très prometteurs pour l'industrie pharmacologique. GC-1 et KB-141 sont par exemple des agonistes sélectifs du récepteur TR β , n'ayant pas d'effets musculaires ni cardiaques. Bien que TR β soit impliqué dans le rétrocontrôle exercé par T3 et T4 sur leur propre synthèse, GC-1 et KB-141 ne bloquent pas la production d'hormone endogène (Baxter et al., 2004; Grover et al., 2007). Cependant, GC-1 peut agir de façon inattendue sur certains gènes-cibles sur un des trois *TRE* présents dans le promoteur de *SERCA2*, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine sur des myocytes néonataux de rat montre que, contrairement à T3, GC-1 ne provoque pas la dissociation des corépresseurs et ne recrute pas les coactivateurs. Il est pourtant capable de se fixer sur TR dans ces cellules, puisqu'il active l'expression de *SERCA2* via les deux autres *TRE* (Gloss et al., 2005).

NH3 possède la particularité de placer le récepteur TR α 1 dans une position moléculaire neutre, ni activatrice, ni répressive (Nguyen et al., 2002). Récemment découvert par screening, ses effets sont encore à évaluer *in vivo*.

Par analogie avec les modulateurs sélectifs des oestrogènes (Smith and O'Malley, 2004), il est possible d'imaginer dans le futur une utilisation pharmacologique de ligands de TR ayant une activité restreinte à un tissu, voir à certains gènes-cibles.

d. Les TR sont de puissants outils moléculaires

Etudier l'action de l'hormone thyroïdienne présente un intérêt médical et plus encore un intérêt fondamental. Puisque T3 est un régulateur majeur du développement de nombreux organes, la manipulation du statut thyroïdien chez le modèle animal permet de perturber et donc de mieux comprendre ce développement. C'est une approche originale pour déterminer comment les cellules reçoivent une information et comment elles répondent à cette information lors des processus d'histogenèse. L'hormone thyroïdienne agissant via des

facteurs de transcriptions, les TR, il est possible d'accéder directement au programme génétique gouvernant le développement de ces organes. Les TR ont l'avantage d'avoir une activité régulée par un ligand, ce qui permet de basculer expérimentalement de la transrépression à la transactivation. Ils constituent donc une voie d'étude originale et puissante pour comprendre comment un facteur de transcription peut réguler spécifiquement l'expression de certains gènes-cibles *in vivo*.

C. Fonctions des TR au cours de l'évolution

a. Actions primitives de l'hormone thyroïdienne

De par ses actions pléiotropiques sur le développement, l'hormone thyroïdienne induit des métamorphoses (au sens large) très diverses chez les Métazoaires. Il est tentant de regrouper ses actions dans un schéma général, afin de leur donner un sens. Cependant, les généralisations abusives sont faciles puisque l'hormone thyroïdienne agit sur un très grand nombre d'organes et que la métamorphose est un phénomène répandu dans le monde animal. Gardons en mémoire que chaque espèce est un cas particulier. Ainsi, T3 est connue pour induire la métamorphose des Amphibiens, alors qu'au contraire, la métamorphose de la lamproie, un vertébré marin, coïncide avec une chute du taux de T4 et de T3 (Manzon et al., 1998), ce qui demeure inexpliqué.

De nombreux auteurs considèrent que les hormones ont pour origine un signal biotique de l'environnement, qui a été internalisé et éventuellement directement synthétisé par l'organisme (Stoka, 1999). Il devient aujourd'hui évident que de l'hormone thyroïdienne exogène, présente dans l'alimentation, agit sur les invertébrés. Elle pourrait ainsi véhiculer des informations issues de l'environnement et permettre d'adapter le métabolisme en réponse (Heyland and Moroz, 2005). Par exemple, chez les insectes, T3 est capable de lier le même récepteur et d'activer la même voie de signalisation que l'hormone juvénile JHIII. D'origine alimentaire, T3 rentrerait de l'hémolymph dans la cellule par endocytose et serait convertie en forme active T2 (diiodothyronine) par une déiodase (Davey, 2000). Si son implication dans la métamorphose des insectes demeure spéculative, elle a été prouvée pour les Echinodermes. La larve de l'oursin *Leodia sexiesperforata*, qui normalement a besoin de se nourrir, se transforme en larve à nutrition facultative lorsqu'elle est expérimentalement exposée à la T4

(Heyland et al., 2004).

La génomique comparative suggère que le prochordé *Ciona intestinalis* est capable de produire de l'hormone thyroïdienne (Dehal et al., 2002). Il n'est cependant pas le premier animal au cours de l'évolution à réaliser une synthèse endogène, puisqu'une analyse par chromatographie sur couche mince suggère qu'elle existe chez *Aplysia californica* et *Lytechinus variegatus*, des mollusques de la classe des Gastéropodes (Heyland et al., 2006). L'*Aplysia* exprime dans ses neurones un orthologue de la thyroperoxydase (Moroz et al., 2006), potentiellement impliqué dans le métabolisme de T3. La synthèse endogène aurait donc évolué de façon indépendante chez divers métazoaires, elle serait ainsi réalisée par différentes voies de signalisation et hébergée dans différentes structures morphologiques. Chez les Protochordés *Amphioxus* et *Ciona intestinalis* (Carosa et al., 1998), il existe un organe homologue de la glande thyroïde, l'endostyle. Cet organe se transforme en authentique glande thyroïde au cours de la métamorphose de la lamproie (Kluge et al., 2005).

b. Rencontre de l'hormone thyroïdienne et des TR

Les récepteurs nucléaires sont dérivés de 25 gènes ancestraux qui sont à l'origine des systèmes endocriniens (Bertrand et al., 2004). Ces gènes sont sans doute issus d'un gène très ancien puisqu'un homologue a été trouvé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Phelps et al., 2006). Un homologue de TR a été identifié chez le schistosome (trématode) (Wu et al., 2006), l'oursin (Howard-Ashby et al., 2006), l'*Amphioxus* et *Ciona intestinalis* (Carosa et al., 1998) tandis que *Drosophila melanogaster* (King-Jones and Thummel, 2005) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Robinson-Rechavi et al., 2005) ont vraisemblablement perdu le gène secondairement. La fonctionnalité de ces TR a été peu étudiée, en particulier leur capacité à lier l'hormone thyroïdienne et leur capacité à réguler l'expression de gènes-cibles de manière hormono-dépendante. Chez l'*Amphioxus* (Mathilde Paris M., communication personnelle) et la lamproie (Weirich et al., 1987), TR est capable de lier T3. Par contre, l'homologue identifié chez *Ciona intestinalis* possède un domaine de liaison à l'ADN bien conservé mais un domaine de liaison du ligand très différent, ne permettant pas au récepteur de lier T3 (Carosa et al., 1998). La présence d'un homologue à un récepteur nucléaire incapable de fixer le ligand est une situation classique, la controverse persiste entre deux interprétations□

1. Au cours de l'évolution le TR de *Ciona intestinalis* a perdu sa capacité à lier T3 (Owen and Zelent, 2000 [Thornton et al., 2003]).
2. Les récepteurs nucléaires étaient à l'origine des facteurs de transcription non hormono-dépendant qui ont secondairement acquis la capacité à lier leur ligand (Laudet, 1997). Si l'action primitive de T3 est effectivement indépendante de TR, les effets non génomiques observés chez les mammifères pourraient être des réminiscences de l'action ancestrale de T3.

c. Les deux gènes *THRA* et *THRB* sont présents chez les poissons

Chez les poissons, l'hormone thyroïdienne induit la métamorphose de nombreuses espèces. T3, T4 et TR sont détectés dans les œufs, même si leur nécessité pendant le développement précoce n'a pas été mise en évidence (Power et al., 2001). La présence des gènes *THRA* et *THRB* a été démontrée pour de nombreuses espèces, en particulier le saumon (Marchand et al., 2001), le poisson rouge (Nelson and Habibi, 2006) et le poisson zèbre, qui possède deux loci de *THRA* (Liu et al., 2000). Bien que TR α 1 soit exprimé dès le début de l'embryogénèse et pourrait fonctionner comme un répresseur transcriptionnel (Essner et al., 1997b), il n'a pas encore été démontré de fonctions propres à TR α ou TR β , hormis une expérience d'expression transitoire surprenante montrant que TR α 1 serait un transactivateur en absence de T3 (Liu et al., 2000).

d. Amplification de la réponse à l'hormone thyroïdienne chez les Amphibiens

Historiquement, l'hormone thyroïdienne a été identifiée comme l'inducteur de la métamorphose des têtards Anoures en grenouille (Gudernatsch 1912). La métamorphose du Xénope peut être considérée comme une adaptation au milieu aérien, à travers un remodelage très important des membres, de la queue, de la peau, du cerveau, de l'intestin, du sang, du système immunitaire, du foie et d'autres organes. Le niveau d'hormone thyroïdienne dans le plasma est étroitement contrôlé par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Denver, 1988). L'hypothalamus devient donc l'organe neuro-endocrinien coordonnateur des signaux environnementaux et alimentaires. Il sécrète la TRH qui active l'expression de la TSH et la

synthèse de l'hormone thyroïdienne. L'action tissulaire de T3 est étroitement contrôlée par des enzymes, en particulier les déiodases (Brown, 2005). Les deux gènes *THRA* et *THRB* de *Xenopus laevis* (Yaoita et al., 1990) codent pour des récepteurs aux fonctions distinctes (Buchholz et al., 2006). L'expression de TR β est très fortement induite par l'hormone thyroïdienne pendant la métamorphose (Yaoita and Brown, 1990), aussi est-il considéré comme un amplificateur de la réponse à T3, dont l'effecteur serait TR α .

Même si les gènes-cibles connus pour être régulés par T3 chez le Xénope (*THRB*, *TH / bZIP*) sont différents de ceux des mammifères, le Xénope est aujourd'hui un modèle intéressant pour étudier l'action de l'hormone thyroïdienne sur le développement des Vertébrés. Les techniques de transgénèse et le séquençage complet du génome de *Xenopus tropicalis* ont permis d'étudier la grande spécificité tissulaire de la réponse, la chronologie précise des modifications morphologiques, les effets directs et indirects de l'hormone et de préciser son mécanisme d'action moléculaire (Furrow and Neff, 2006). Par exemple, l'importance des cofacteurs de transcription sur l'activité ligand dépendante des TR a été mise en évidence *in vivo*. La surexpression d'une forme dominante négative du corépresseur NCoR, muté dans son domaine d'interaction avec TR, montre qu'il est requis pour la répression des gènes-cibles de T3 avant la métamorphose (Sachs et al., 2002). De même, la surexpression d'une forme dominante négative du coactivateur SRC3, mutée dans le domaine d'interaction avec TR, montre qu'il est requis pour le programme de résorption des tissus larvaires pendant la métamorphose et il pourrait contribuer à la croissance et au développement des tissus adultes (Paul et al., 2005). Ces cofacteurs de transcription sont donc indispensables *in vivo* pour que TR ait une activité normale. Il a été également démontré que TR non lié T3 a un rôle physiologique au cours du développement embryonnaire, cette action sera développée dans la discussion.

e. Diversification des fonctions des TR chez les mammifères

Chez les mammifères, le niveau d'hormone thyroïdienne augmente fortement autour de la naissance □ au cours du second semestre de gestation pour l'homme, durant les quinze premiers jours de vie chez les rongeurs. T3 est nécessaire au développement de nombreux organes, en particulier le cerveau, les os, les muscles et l'intestin, ce qui lui confère un rôle

majeur dans l'adaptation de l'embryon, aquatique, à la vie aérienne. La principale différence avec les Amphibiens est l'absence d'expression auto-inductible de TR β elle pourrait expliquer que les mammifères ne subissent pas de véritable métamorphose. L'accumulation d'isoformes des TR à rôle antagoniste, TR α 2 et les isoformes tronquées TR α Δ 1, TR α Δ 2 et TR α Δ 6, pourrait être responsables d'un amoindrissement de la réponse tissulaire à l'hormone (Macchia et al., 2001), bien qu'un TR α 2 et une isoforme TR α tronquée aient également été identifiées chez le poisson rouge (Nelson and Habibi, 2006). Tout simplement, la spécificité d'action des TR pourrait avoir augmenté au cours de l'évolution.

A l'âge adulte, l'hormone thyroïdienne est fortement impliquée dans le métabolisme et le maintien de l'homéostasie. Elle stimule le métabolisme, *via* une mobilisation des graisses, elle favorise l'oxydation des acides gras, la néoglucogénèse et l'entrée du glucose dans les cellules. Elle régule également la thermogénèse. Par exemple, le niveau de T3 et de T4 chute lorsque l'ours brun entre en hibernation (Tomasi et al., 1998). L'axe thyroïdien est donc impliqué dans l'adaptation à l'environnement. La régulation de la reproduction saisonnière chez certaines espèces en est un autre exemple. Chez la plupart des animaux des régions tempérées, la reproduction est sous le contrôle de la photopériode. Pour les espèces se reproduisant au printemps, la mélatonine produite lorsque les jours s'allongent induit l'expression de la *D2* (Revel et al., 2006), qui catalyse la conversion de T4 en T3 pour réguler la réponse des gonades à la photopériode (Yoshimura et al., 2003 ; Watanabe et al., 2004). La T3 exogène mime l'action des jours longs notamment chez le hamster de Sibérie (Freeman et al., 2007). Chez la chèvre Saanen, l'expression de la *D2* dans l'hypothalamus est au contraire inhibée par l'allongement de la photopériode (Yasuo et al., 2006), ce qui expliquerait sa reproduction hivernale. L'hormone thyroïdienne relie également la photopériode au rythme reproductif chez les oiseaux (Yoshimura, 2006).

L'hormone thyroïdienne est donc un exemple d'hormone impliquée dans les transitions physiologiques et ontologiques ainsi que dans leur évolution (Heyland et al., 2005).

D. Actions de l'hormone thyroïdienne chez la souris

Les principales fonctions développementales et physiologiques des TR seront décrites chez la souris.

a. Intérêt du modèle souris

1. Les modèles d'hypothyroïdie

Pour étudier les conséquences de l'hypothyroïdie chez le rat et la souris, des techniques expérimentales ont été développées. La première méthode a consisté en une ablation chirurgicale de la thyroïde ou thyroïdectomie chez les rats nouveau-nés. Mais cette technique de micro-chirurgie est particulièrement délicate à réaliser. De plus, les cellules sécrétant la calcitonine et la glande parathyroïde qui sécrète la parathormone sont conjointement excisées, ce qui dérégule le métabolisme phosphocalcique. Un biais expérimental est donc introduit. La seconde méthode consiste à utiliser des inhibiteurs chimiques de la synthèse de l'hormone thyroïdienne. Les molécules les plus utilisées appartiennent à deux familles : les dérivés du mercapto-imidazole comme le méthimazole (MMI) et les dérivés du thiouracile, par exemple le méthylthiouracile (MTU) et le propylthiouracile (PTU). Ces molécules inhibent la fonction thyroïdienne à différents niveaux. Dans la thyroïde, elles entrent en compétition avec l'iode et elles inhibent la thyropéroxydase (Engler et al., 1983). De plus, leurs métabolites inhibent l'activité de la D1, ce qui diminue la conversion périphérique de T4 en T3 (Oppenheimer et al., 1972). Ces molécules sont administrées dans l'alimentation des femelles gestantes ou allaitantes pour provoquer une hypothyroïdie expérimentale chez les nouveau-nés. Mais ces traitements pourraient présenter des effets secondaires ou une toxicité non maîtrisée.

Ainsi des modèles murins modifiés génétiquement sont maintenant préférés. La méthode d'inactivation génétique par recombinaison homologue a permis de générer des souris mutantes pour :

1. Un gène nécessaire à l'organogénèse de la thyroïde : *TTF1* (Kimura et al., 1996), *FOXE1/TTF2* (De Felice et al., 1998), *Pax8* (Mansouri et al., 1998).
2. Un gène nécessaire à l'hormonogénèse : *TSHR* (Récepteur de la TSH) chez les souris *hyt/hyt* (Stein et al., 1994), *TRH* (Yamada et al., 1997), *TSH α* (Kendall et al., 1995), *TPO* (Thyropéroxydase) (Takabayashi et al., 2006), *TG* (Thyroglobuline) (Kim et al., 1998), *NIS*

(*Transporteur Sodique d'Iode*) (Fujiwara et al., 1997), voire nécessaire au développement entier de l'hypophyse \square *Pit1* (Li et al., 1990), *Prop1* (Sornson et al., 1996).

3. Un gène codant pour un transporteur de l'hormone, par exemple *MCT8* (Dumitrescu et al., 2006).

Compte tenu de la multitude de modèles existants, une description exhaustive serait rébarbative. Par conséquent, seul le modèle murin le plus spécifique, c'est-à-dire les souris invalidées pour le gène *Pax8*, sera présenté.

2. Les souris *Pax8*^{-/-}

Le gène *Pax8* code pour un facteur de transcription exprimé dans la thyroïde et le rein, il est requis pour la différenciation des cellules précurseurs en thyrocytes. Les souris *Pax8*^{-/-} ont une thyroïde réduite, constituée uniquement de cellules à calcitonine (Mansouri et al., 1998). Elles présentent comme seule anomalie primaire une absence totale de synthèse d'hormone thyroïdienne. Elles présentent les défauts caractéristiques de l'hypothyroïdie : TSH élevée, croissance diminuée, retard d'ossification, retard de développement de l'intestin et du cerveau. Elles ne survivent pas plus de deux semaines après la naissance, mais elles peuvent être sauvées par des injections quotidiennes de T4 durant les trois premières semaines de vie post-natales. Elles constituent donc un bon modèle pour étudier les effets de l'hypothyroïdie sur le développement post-natal précoce.

Cependant, en l'absence d'autre modèle complètement dépourvu d'hormone thyroïdienne, il n'est pas exclu que ce phénotype très sévère résulte de l'absence de PAX8 dans un autre organe. Par exemple, les femelles *Pax8*^{-/-} ayant reçu des injections de T4 depuis l'âge de 2 jours post-natal jusqu'à normaliser un statut euthyroïdien sont infertiles \square elles n'ont pas d'utérus fonctionnel, seulement des résidus de tissu endométral, ainsi qu'un défaut d'ouverture vaginale (Mittag et al., 2007). Parallèlement, les mâles *Pax8*^{-/-} sauvés par l'injection de T4 ont des conduits efférents dont la lumière est réduite (Wistuba et al., 2007). Ces défauts suggèrent une action morphogénétique de PAX8 sur le développement des canaux génitaux, de façon indépendante de T3. Cependant, comme *Pax8* n'est pas exprimé dans ce tissu (Poleev et al., 1992), il est plus probable que ce phénotype résulte de l'absence de T3 avant P2, date à laquelle l'hormone a été injectée pour sauver les souris.

3. Les souris invalidées pour une ou plusieurs isoformes de TR

Les souris dont un des récepteurs de l'hormone thyroïdienne a été inactivé ont permis de préciser le rôle spécifique de chacune des isoformes de TR. Flamant et al. ont récemment recensé les lignées de souris transgéniques actuellement disponibles (figure 8) (Flamant et al., 2006b).

Trois délétions ont été réalisées dans le locus *THRB* : deux lignées de souris *TRβ^{-/-}* n'ont ni récepteur TRβ1, ni TRβ2 (Forrest et al., 1996 ; Gauthier et al., 1999), tandis que les souris *TRβ2^{-/-}* sont seulement dépourvues de TRβ2 (Abel et al., 1999b). Toutes ces souris présentent une hyperthyroïdie comparable, ce qui montre que TRβ2 est nécessaire pour réprimer la synthèse de l'hormone thyroïdienne. La présence chez ces souris d'une concentration supraphysiologique de T3 et T4, capable d'activer le récepteur TRα1, introduit un biais important dans l'interprétation de leur phénotype.

L'analyse phénotypique des souris *TRα^{0/0}*, totalement dépourvues des isoformes TRα (Gauthier et al., 2001) a montré que le gène *THRA* est quant à lui crucial pour le développement post-natal. Les souris *TRα^{-/-}*, dépourvues des récepteurs TRα1 et TRα2 mais surexprimant les isoformes courtes TRΔα1 et TRΔα2 (Fraichard et al., 1997) ont permis de mettre en évidence leur action délétère sur le développement de l'intestin, à l'origine de la mort des souris juste après le sevrage (Plateroti et al., 2001). Ces isoformes, codées à partir d'un promoteur interne de TRα et incapables de se fixer à l'ADN (Chassande et al., 1997), n'avaient jusqu'alors qu'une existence putative. Les souris *TRα1^{-/-}* (Wikstrom et al., 1998), seulement dépourvues de TRα1 et de TRΔα1, ont démontré l'implication directe de TRα1 dans la fonction cardiaque et la thermogénèse (Wikstrom et al., 1998). Des souris *TRα2^{-/-}* ont également été générées, mais leur phénotype est difficile à interpréter car la modification du locus conduit à une surexpression concomitante de TRα1 (Salto et al., 2001).

Notons que la délétion d'une isoforme peut être compensée. Par exemple, en absence de récepteurs TRβ, TRα1 peut suppléer à sa fonction alors qu'il n'exerce pas ce rôle dans un contexte normal. Par exemple, en absence de TRβ, TRα pourrait réprimer lui-même l'expression de *TSHα* et de *TSHβ*, ce qui expliquerait que le niveau de TSH ne soit que modérément élevé chez les souris *TRβ^{-/-}* (Forrest et al., 1996 ; Gauthier et al., 1999) par rapport aux souris exprimant des récepteurs TRβ mutés (Kaneshige et al., 2000 ; Hashimoto et al., 2001a) (Ortiga-Carvalho et al., 2005) (Shibusawa et al., 2003b). Lorsque *THRA* est

Gène	Nom de l'allèle	Type de mutation	Isoformes supprimées	Isoformes mutées	Références
THRA	$TR\alpha 1^{-}$	KO	TR α 1 TR $\Delta\alpha$ 1	TR α 1 TR $\Delta\alpha$ 1 TR α 1 TR $\Delta\alpha$ 1 TR α 1 TR $\Delta\alpha$ 1	(Wikstrom et al., 1998)
	$TR\alpha 2^{-}$	KO	TR α 2 TR $\Delta\alpha$ 2		(Salto et al., 2001)
	$TR\alpha^{-}$	KO	TR α 1 TR α 2		(Fraichard et al., 1997)
	$TR\alpha^0$	KO	TR α 1 TR α 2 TR $\Delta\alpha$ 1 TR $\Delta\alpha$ 2		(Gauthier et al., 2001)
	$TR\alpha^7$	KO	TR $\Delta\alpha$ 1 TR $\Delta\alpha$ 2		(Plateroti et al., 2001)
	$TR\alpha^{PV}$	KI	TR α 2 TR $\Delta\alpha$ 2		(Kaneshige et al., 2001)
	$TR\alpha^{R348C}$	KI	TR α 2 TR $\Delta\alpha$ 2		(Tinnikov et al., 2002)
	$TR\alpha^{P398H}$	KI			(Liu et al., 2002)
THRB	$TR\beta^{-}$	KO	TR β 1 TR β 2	TR β 1 TR β 2 TR β 1 TR β 2 TR β 1 TR β 2 TR β 1 TR β 2	(Gauthier et al., 1999)
	$TR\beta^{tm1Df}$	KO	TR β 1 TR β 2		(Forrest et al., 1996)
	$TR\beta^{tm2Df}$	KO	TR β 2		(Ng et al., 2001)
	$TR\beta 2^{-}$	KO	TR β 2		(Abel et al., 1999)
	$TR\beta^{KO}$	KO	TR β 1 TR β 2		(Abel et al., 2003)
	$TR\beta^{PV}$	KI			(Kaneshige et al., 2000)
	$TR\beta^{D337T}$	KI			(Hashimoto et al., 2001)
	$TR\beta^{E457A}$	KI			(Ortiga-Carvalho et al., 2005)
	$TR\beta^{GS125}$	KI			(Shibusawa et al., 2003)

KO = Délétion KI = Mutation

Figure 8 : Allèles mutants pour les gènes codant pour les TR chez la souris
(Flamant et al., 2006)

invalidé conjointement à *THRB*, le niveau de TSH est très fortement augmenté, ce qui renforce cette hypothèse (Gauthier et al., 2001). Une étude réalisée sur les récepteurs de l'acide rétinoïque RAR a prouvé que la situation knock-out pouvait induire de tels artéfacts. En utilisant des ligands activant spécifiquement l'une des isoformes de RAR, les auteurs ont notamment montré que l'expression de RAR β 2 est auto-inductible dans des cellules *RAR γ ^{-/-}* alors qu'elle ne l'est pas dans les cellules sauvages ou *RAR α ^{-/-}* (Taneja et al., 1996). Il faut donc garder à l'esprit que la situation knock-out est artificielle.

La situation knock-in sera traitée dans la troisième partie de l'introduction.

b. Actions pléiotropiques de l'hormone thyroïdienne sur le développement et la physiologie adulte

Le tableau 1 récapitule les fonctions de T3 chez la souris et les principaux phénotypes associés à des délétions / mutations de *THRA* ou de *THRB*, sans prétendre être exhaustif.

D'après ce tableau, il est clair que l'hormone thyroïdienne a des actions pléiotropiques au cours du développement post-natal et chez l'adulte. Les récepteurs TR α et TR β ont des fonctions distinctes. TR α joue donc un rôle majeur dans la transition foetale et la vie post-natale, vestige potentiel de la métamorphose.

L'action de T3 sur la prolifération et la maturation des progéniteurs cellulaire n'est pas homogène, elle dépend strictement du type cellulaire, du stade de différenciation, du stade patho-physiologique et du contexte cellulaire (Puzianowska-Kuznicka et al., 2006).

Les gènes-cibles activés par T3 sont différents selon les tissus. Dans le cerveau, l'hormone thyroïdienne accélère les changements d'expression des gènes qui se produisent normalement au cours du développement (Bernal, 2002). Beaucoup de gènes réprimés pendant les quinze premiers jours de vie lors d'hypothyroïdie ont ensuite une expression normale, même si l'hypothyroïdie persiste (Farsetti et al., 1992□Zou et al., 1994□Ghorbel et al., 1999□Takahashi et al., 2005). Les gènes-cibles de T3 ont chacun une période critique durant laquelle T3 peut réguler leur expression, le moment et la durée de cette période varient selon les gènes. Les effets de T3 sur le transcriptome dépend considérablement du stade de développement et de la région du cerveau (Iniguez et al., 1993□Rodriguez-Pena et al., 1993□Iniguez et al., 1996□Alvarez-Dolado et al., 1999b□Alvarez-Dolado et al., 1999a□Koibuchi et al., 1999).

Tableau 1

Tissu	St	Phénotype hypothyroïdien	Isoforme Fonctionnelle	Cible	Gènes-cibles dont la dérégulation se responsable du phénotype *
Cervelet	P	Arborisation des cellules de Purkinje réduite Persistance de la couche granulaire externe Retard de myélinisation (Legrand, 1982)	TR α 1 (Morte et al., 2002)	Tous les types cellulaires ?	<i>BDNF</i> (Neveu and Arenas, 1996) <i>NT-3</i> (Charrasse et al., 1992) <i>MBP</i> (Munoz et al., 1991) <i>Reelin</i> (Alvarez-Dolado et al., 1999) <i>RC3</i> (Iniguez et al., 1993)
Os	P	Nanisme (Tinnikov et al., 2002) Retard de l'ossification endochondrale (Gauthier et al., 1999)	TR α et TR β (O'Shea et al., 2005)	Chondrocytes de la plaque de croissance (Robson et al., 2000)	<i>FGFR1</i> (Stevens et al., 2003) <i>GHR</i> (Gevers et al., 2002)
Rate	P	Anémie (Green and Ng, 1986)	TR α (Angelin-Duclos et al., 2005)	Erythroblastes (Angelin-Duclos et al., 2005)	?
Cochlée	P	Surdité (Deol, 1973)	TR β 1 (Forrest, 1996) (Ng et al., 2001a) TR α 1 (Ng et al., 2001a)	Cellules ciliées externes de la cochlée (Deol, 1973)	<i>Prestin</i> (Weber et al., 2002) <i>KCNQ4</i> (Winter et al., 2006) <i>Slc26a5</i> (Weber et al., 2002)
Rétine	P	Daltonisme (Newell and Diddle, 1977)	TR β 2 (Ng et al., 2001b)	Cônes M (Ng et al., 2001b)	<i>Opsine M</i> et répression <i>Opsine S</i> (Ng et 2001b) (Roberts et al., 2006)
Intestin	P	Diminution de l'absorption intestinale (Weinstein et al., 1990) Muqueuse hypotrophée (Henning et al., 1994) Diminution de la prolifération de l'épithéliale	TR α 1 (Gauthier et al., 2001) TR α 1 et TR α 2 ? (Plateroti et al., 2001)	Progéniteurs des cellules épithéliales (Plateroti et al., 2006)	<i>β-caténine, c-myc</i> (Plateroti et al., 2006) <i>Cycline D1 et D2</i> (Chandrasekaran et al., Freund et al., 1998)
Muscles squelettiques	P	Augmentation des fibres I à métabolisme oxydatif (Gambke et al., 1983)	TR α 1 (Johansson et al., 2000; Yu et al., 2000) et TR β (Mansen et al., 2001) TR α 6 (Casas et al., 2006)	Myoblastes (Brodie, 1990)	<i>MHCα</i> (Gloss et al., 1999) <i>MHCβ</i> réprimé (Edwards et al., 1999) <i>SERCA1</i> (Johansson et al., 2000)
Testicule	P	Augmentation de la taille du testicule adulte (Cooke and Meisami, 1991)	TR α 1 (Holsberger et al., 2005)	Cellules de Sertoli (Palmero et al., 1989) Cellules de Leydig (Mendis- Handagama and Ariyaratne, 2004)	<i>Skp2</i> (Holsberger and Cooke, 2005) <i>p27^{Kip1}</i> (Holsberger et al., 2003) <i>p21^{Cip1}</i> (Buzzard et al., 2003)

St : Stade, P = post-natal, A = adulte

Tableau 1 suite

Tissu	St	Phénotype hypothyroïdien	Isoforme Fonctionnelle	Cible	Gènes-cibles d responsa
Hypo- physe	P A	Induit une hypertrophie de la thyroïde et une hyperthyroïdie périphérique Nanisme (Tinnikov et al., 2002)	TRβ2 (Abel et al., 1999; Forrest et al., 1996; Gauthier et al., 1999)	Cellules thyroïdées et lactotroques (Szabo et al., 1984)	Répression de <i>TS</i> <i>GH</i> (
Coeur	P A	Bradychardie	TRα1-/- (Wikstrom et al., 1998)	Myocytes cardiaques	<i>HCN2</i> et <i>H</i> <i>SERCA2</i> , <i>Na⁺/K⁺ATPase</i> (<i>MHC</i> <i>MHCβ</i> réprim
Tissu adipeux brun	A	Température corporelle réduite (Edelman, 1974)	TRα1 (Wikstrom et al., 1998) (Marrif et al., 2005) (Liu et al., 2003) Et TRβ (Gauthier et al., 2001) (Ribeiro et al., 2001) (Golozoubova et al., 2004)	Désensibilisation adrénergique des adipocytes (Golozoubova et al., 2004)	<i>UCPI</i> (Sil <i>Déiodinase</i>
Foie	A	Augmentation du glycogène hépatique (Weiss et al., 1998)	TRβ (Flores-Morales et al., 2002) (Yen et al., 2003)	Hépatocytes (Malbon et al., 1980) (Torres et al., 1999) (Feng et al., 2001)	<i>G3PD</i> <i>Spot 14</i> <i>Acétyl-coA carb</i> <i>Acide gras sym</i> <i>CYP7A</i> <i>Enzyme malique</i> <i>SERBP-1c</i> (
Sérum	A	Hypercholestérolémie Hypertriglycéridémie (Roberts and Ladenson, 2004)	TRβ (Johansson et al., 2005)	LDL (Low Density Protein) (Shin and Osborne, 2003) Transport du glucose, de l'insuline (Weinstein et al., 1994) et des lipides (Lin-Lee et al., 1993) (Strobl et al., 1992)	<i>SREBP-2</i> (S <i>GLUT1</i> et <i>GL</i> (Torr <i>IGFBP2</i> (Inukai e

St : Stade, P = post-natal, A = adulte

Dans la seconde partie de cette introduction, le mécanisme d'action de T3 sera étudié afin de comprendre comment la signalisation de T3 est régulée à l'échelle tissulaire, cellulaire et intracellulaire pour permettre d'activer l'expression d'un gène-cible donné, de manière spécifique dans le temps et dans l'espace.

II. Mécanismes moléculaires d'action de l'hormone thyroïdienne

A. Modulation de la signalisation de T3 par la disponibilité de l'hormone thyroïdienne

a. Disponibilité de T3 dans le milieu extra-cellulaire

La liaison de T3 constitue le premier niveau de régulation de l'activité de TR. Afin de montrer que la biodisponibilité locale de T3 est un facteur régulateur majeur de la signalisation de l'hormone thyroïdienne, nous prendrons deux exemples □ la rétine et le cerveau.

1. Dans la rétine

La vision des couleurs est facilitée par différentes populations de cônes (des photorécepteurs). La plupart des mammifères ont deux types de cônes, qui contiennent soit de l'OPSINE M, sensibles à des longueurs d'onde moyennes (vert), soit de l'OPSINE S, sensible à des longueurs d'onde courtes (bleu). Chez la souris, les opsines M et S sont exprimées selon des gradients dorso-ventraux opposés. La mise en place de ce patron d'expression nécessite TR β 2, puisque les souris *TR β 2^{-/-}* présentent une perte sélective des cônes M et une augmentation concomitante des cônes S (Ng et al., 2001b). TR β 2 active l'expression de l'*Opsine M* et réprime l'expression de l'*Opsine S*. Autour de P10, le récepteur est spécifiquement activé dans la rétine dorsale car il existe un gradient transitoire de la concentration d'hormone thyroïdienne dans la rétine (Roberts et al., 2006). Cette régulation de l'activité des TR par un gradient de T3 a aussi été décrit dans l'œil de Xénope, pendant la métamorphose □ (Marsh-Armstrong et al., 1999b). Dans cette espèce, le gradient est généré par

une forte expression de la *D3*, qui code pour l'enzyme dégradant la T3, dans la rétine dorsale. Cependant, ce n'est pas le cas chez la souris, pour laquelle un autre mécanisme, encore inconnu, est impliqué (Roberts et al., 2006). Cet exemple montre que la concentration locale de T3 est un premier niveau de régulation de l'activité des TR.

2. Dans le cerveau

Dans le cerveau, la distribution de T3 dans le cerveau a été déterminée par différentes techniques. L'injection de [¹²⁵I]T3 ou de [¹²⁵I]T4, suivie d'un autoradiogramme sur coupes de cerveau (Pinna et al., 2002), a montré que l'entrée de T3 et de T4 dans le cerveau est hétérogène. Chez le rat, un dosage biochimique de T3 dans différentes fractions du cerveau montre des variations de 1 pmol/g dans le cervelet à 2,8 pmol/g dans le mésencéphale. La concentration de T3 est aussi soumise à des variations circadiennes. Par exemple, à 14 heures, elle est 1,6 fois plus élevée qu'à minuit dans le mésencéphale et le cervelet de rat (Pinna et al., 2002). Un immunomarquage anti-T3 (Rozanov and Dratman, 1996) a permis de visualiser l'hétérogénéité de la distribution de T3 directement sur des coupes histologiques de cerveau. Mais les résultats obtenus ne sont pas toujours en accord avec les dosages, laissant supposer que l'accessibilité de T3 à l'anticorps n'est pas uniforme. Malgré les limites des techniques utilisées, il est clair que la distribution de T3 dans le cerveau est hétérogène.

Pour expliquer cette distribution hétérogène, de nombreuses études ont été menées sur les particularités du métabolisme cérébral de T3. C'est essentiellement T4 qui franchit la barrière hémato-méningée, elle est convertie localement en T3 par la D2. L'expression de la *D2* augmente lorsque la quantité de T4 diminue, ce qui permet de préserver une concentration normale de T3 (Guadano-Ferraz et al., 1999). Au contraire, de fortes concentration de T3 et T4 stimulent l'expression locale de la *D3*, qui code pour l'enzyme les dégradant. Le cerveau est donc protégé des fluctuations importantes du niveau de T3. Ces déiodases sont des sélénoprotéines à activité locale, dont le patron d'expression est restreint. Par exemple, la *D3* est fortement exprimée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, les cellules granulaires du gyrus dentelé et les couches II à VI du cortex cérébral (Tu et al., 1999). La *D2* est exprimée essentiellement dans trois types cellulaires : les cellules gliales, les tanicytes bordant le troisième ventricule et les astrocytes dans tout le cerveau (Guadano-Ferraz et al., 1997a). Le niveau d'expression des déiodases n'est pas exactement corrélé à leur activité

enzymatique□ la D2 a une activité 4 fois plus élevée dans le cortex frontal que dans le mésencéphale, la D3 a une activité 17 fois plus élevée dans l'amygdale que dans le mésencéphale. Pinna et al. (Pinna et al., 2002) ont mesuré le degré de corrélation entre le niveau d'activité de la D2 ou de la D3 et la concentration de T3 dans sept fractions du cerveau du rat adulte. Ils obtiennent un résultat significatif uniquement entre la concentration de T3 et l'activité de la D3.

Chez la souris, l'inactivation du gène codant pour la *D3* par mutation du codon sélénocystéine a montré une empreinte génétique chez le fœtus□l'allèle paternel est cinq fois plus exprimé que l'allèle maternel (Hernandez et al., 2002). Les souris *D3*^{-/-} ne présentent qu'une augmentation précoce et transitoire du niveau d'hormone thyroïdienne dans le sang et le cerveau. A partir de P15 et tout au long de la vie adulte, elles présentent paradoxalement des niveaux de T3 et de T4 réduits (Hernandez et al., 2006). Le gène codant pour la *D2* étant situé sur un locus voisin, il pourrait également être soumise à une empreinte. Les souris *D2*^{-/-} ont un niveau de T3 normal, mais, de façon surprenante, elles présentent un niveau de T4 élevé ainsi qu'une augmentation de l'activité de la D3 dans le cortex cérébral (Schneider et al., 2001). Ni l'inactivation de *D2* ni celle de *D3* n'entraînent une dérégulation complète du niveau de T3 dans la circulation ou le cerveau (Germain et al., 2005□ Galton, 2005). Par contre la mutation du gène *SECISBP2*, qui code pour un régulateur commun de la traduction des sélénoprotéines, entraîne quant à elle un très faible niveau de T3 circulante (Dumitrescu et al., 2005). Ainsi d'autres sélénoprotéines seraient impliquées dans le métabolisme de l'hormone. Des mécanismes cataboliques alternatifs à la déiodation pourraient aussi exister : sulfatation et glucuronidation du groupe hydroxyl phénolique des iodothyronines, déamination oxydative et décarboxylation de la chaîne des formes acides iodothyroacétiques (Wu et al., 2005).

Toutefois le métabolisme de T3 ne peut pas expliquer à lui seul la distribution hétérogène de T3 dans le milieu extracellulaire cérébral. Le transport de l'hormone le long des axones des neurones pourrait aussi influencer sa concentration locale (Gordon et al., 1999). En effet, une lésion du locus cœruleus diminue la quantité de T3 dans les noyaux cellulaires et les axones des neurones noradrénergiques de l'hippocampe et du cortex cérébral. T3 serait donc accumulée dans le locus cœruleus et distribuée aux cibles post-synaptiques *via* un transport axonal antérograde. Cette hypothèse reste à vérifier.

b. Franchissement des membranes plasmiques

Le passage transmembranaire de l'hormone thyroïdienne apporte un second niveau de contrôle. En raison du caractère lipophile de T3, il a longtemps été considéré comme passif, alors qu'il nécessite des transporteurs consommateurs d'énergie (Hennemann, 2005). NTCP (Polypeptide CoTransporteur de Na⁺/taurocholate), des transporteurs d'anions organiques de la famille OATP (Polypeptides Organiques Transporteurs d'Anions) et des transporteurs d'acides aminés neutres LAT1 et LAT2 (Transporteurs d'Acide aminés neutres Large) modulent le passage de T3 à travers la membrane plasmique (Jansen et al., 2005). OATPC1 a une forte affinité et une spécificité pour T4. De plus il est fortement exprimé dans les capillaires du cerveau (Pizzagalli et al., 2002). Cet ensemble de caractéristiques fait que OATPC1 pourrait être impliqué dans le transport de T4 à travers la barrière hémato-méningée.

MCT8 (Transporteur d'acides MonoCarboxyliques 8) un transporteur de T3 (Friesema et al., 2003) fortement exprimé dans le foie et le cerveau, en particulier dans les neurones sensibles à l'hormone thyroïdienne (Heuer et al., 2005). Chez l'homme, des mutations du gène *MCT8* ont été associées à un retard mental sévère et une concentration élevée de T3 dans le sérum (Jansen et al., 2005 □ Jansen et al., 2007). Chez la souris, le locus de *MCT8* se situe sur le chromosome X. Chez la souris mâle *MCT8*-/Y, bien que le niveau de T3 sérique soit effectivement augmenté, il n'existe pas de signes neurologiques évidents (Dumitrescu et al., 2006). Une autre lignée de souris invalidées pour *MCT8*, générée indépendamment, confirme l'absence de phénotype cérébral hypothyroïdien. Cependant une réduction significative du niveau d'expression de *RC3*, un gène-cible de T3, a été mise en évidence dans les neurones du striatum (Trajkovic et al., 2007). L'entrée de T3 dans les neurones serait donc affectée seulement dans certaines régions du cerveau. Les élévations de l'activité de la D1 et de la D2, hétérogènes selon les tissus, pourraient compenser l'absence de MCT8 et révéler des dépendances à ce transporteur variables selon le type cellulaire (Dumitrescu et al., 2006). La fonction de MCT8 serait moins bien suppléée chez l'homme.

Les modèles de souris invalidées pour des transporteurs membranaires de T3, dont le nombre croît rapidement, mettent maintenant en évidence leur rôle important sur la signalisation de T3.

B. Régulation de la signalisation de T3 dans le noyau

La disponibilité locale de l'hormone n'est pas le seul facteur qui régule la signalisation de T3. La sensibilité à T3 peut varier dans une cellule : chez le Xénope, il est connu que T3 induit l'expression de TR β pendant la métamorphose (Buchholz et al., 2005). Chez les mammifères, l'expression de TR α 1 augmente de 80% quand les macrophages sont activés par les lipopolysaccharides, et l'interféron γ active l'expression de *THRA* et *THRB* (Barish et al., 2005). A ce jour, ce mécanisme est cependant très ponctuel. Plus que son niveau d'expression, c'est surtout l'activité de TR qui est étroitement régulée dans le noyau. Afin de comprendre comment, nous préciserons d'abord le modèle d'action actuel des TR.

a. Le mode d'action des TR est dynamique

1. Navette nucléo-cytoplasmique

TR est un récepteur nucléaire. Bien que sa localisation nucléaire soit fortement favorisée, l'expression d'une protéine fusion TR-GFP dans les cellules Hela a montré que le récepteur se déplace en fait en permanence entre le noyau et le cytoplasme (Baumann et al., 2001). Des inhibiteurs génériques de transporteur n'affectent pas son entrée dans le noyau, suggérant ainsi qu'il peut franchir la membrane nucléaire par diffusion passive. Cependant, sa navette nucléo-cytoplasmique est abolie dans des cellules privées d'ATP, ce qui montre qu'une des étapes requiert un transport actif (Bunn et al., 2001). La calréticuline pourrait être la protéine qui exporte TR du noyau (Shank and Paschal, 2005).

Pour retenir TR dans le noyau, la fixation de TR à l'ADN n'est pas requise, ce sont les interactions protéiques qui ont un rôle important. En absence de ligand, la rétention nucléaire de TR est favorisée par la coexpression de son partenaire d'hétérodimérisation RXR (Baumann et al., 2001). La localisation nucléaire de TR dépend également de sa phosphorylation dans le domaine de liaison à l'ADN. Dans l'oocyte de Xénope, TR α 1 phosphorylé est détecté dans le noyau, tandis que TR α 1 non phosphorylé n'est détecté que dans le cytoplasme (Nicoll et al., 2003). L'état de phosphorylation naturel de TR α 1 change rapidement et sa phosphorylation s'effectue dans le noyau, ce qui suggère que son trafic et donc son activité seraient régulés par des kinases nucléaires.

Dans les ovocytes de Xénope, il a été montré que la présence de T3 augmente la rétention nucléaire de TR α 1 (Bunn et al., 2001) bien qu'une expérience de retour de la fluorescence après photo-inactivation ne l'ait pas confirmé (Maruvada et al., 2003).

2. Cycles transcriptionnels

Dans le noyau, le complexe TR / RXR fixé sur les *TRE* interagit avec des complexes macromoléculaires de corépresseurs (en absence de T3) ou de coactivateurs (en présence de T3). Les corépresseurs et les coactivateurs sont définis comme des protéines qui régulent son activité transcriptionnelle et qui interagissent directement avec TR, ou qui appartiennent à des complexes moléculaires interagissant directement avec TR. Ils sont séparés en quatre groupes fonctionnels :

1. les cofacteurs déplaçant les nucléosomes sur la chromatine
2. les cofacteurs responsables de modifications post-traductionnelles la queue des histones
3. les membres du complexe TRAP / Médiateur
4. les facteurs généraux de la transcription, comme TFIIB.

L'alignement de leurs séquences a permis d'identifier deux motifs d'interaction avec le domaine de liaison du ligand de TR. Quand TR est sous la conformation aporécepteur, un sillon amphipathique de TR interagit avec les motifs (I/L)XX(I/V)I (boîte CoRRN) des corépresseurs. Quand TR est sous la configuration holorécepteur, un sillon hydrophobe de TR interagit avec le motif stéréospécifique des coactivateurs, LXXLL (boîte RN) (Glass and Rosenfeld, 2000) (figure 4). Ce modèle est à nuancer, puisque le corépresseur NCOR possède un motif LXXLL impliqué dans son interaction avec TR (Loinder and Soderstrom, 2004). L'interaction de TR avec les coactivateurs à activité histone transférase et les corépresseurs recrutant les histones déacétylases sont indispensables à l'action de l'hormone thyroïdienne *in vivo* (Paul et al., 2005 □ Sachs et al., 2002).

Un très grand nombre de cofacteurs des récepteurs nucléaires ont été identifiés (Rosenfeld et al., 2006). Deux modèles peuvent être envisagés □

1. Une régulation combinatoire reposant sur l'expression de certains cofacteurs dans une cellule
2. Un modèle séquentiel, dans lequel les cofacteurs sont recrutés successivement par TR / RXR sur un *TRE*.

Activités enzymatiques des complexes coactivateurs

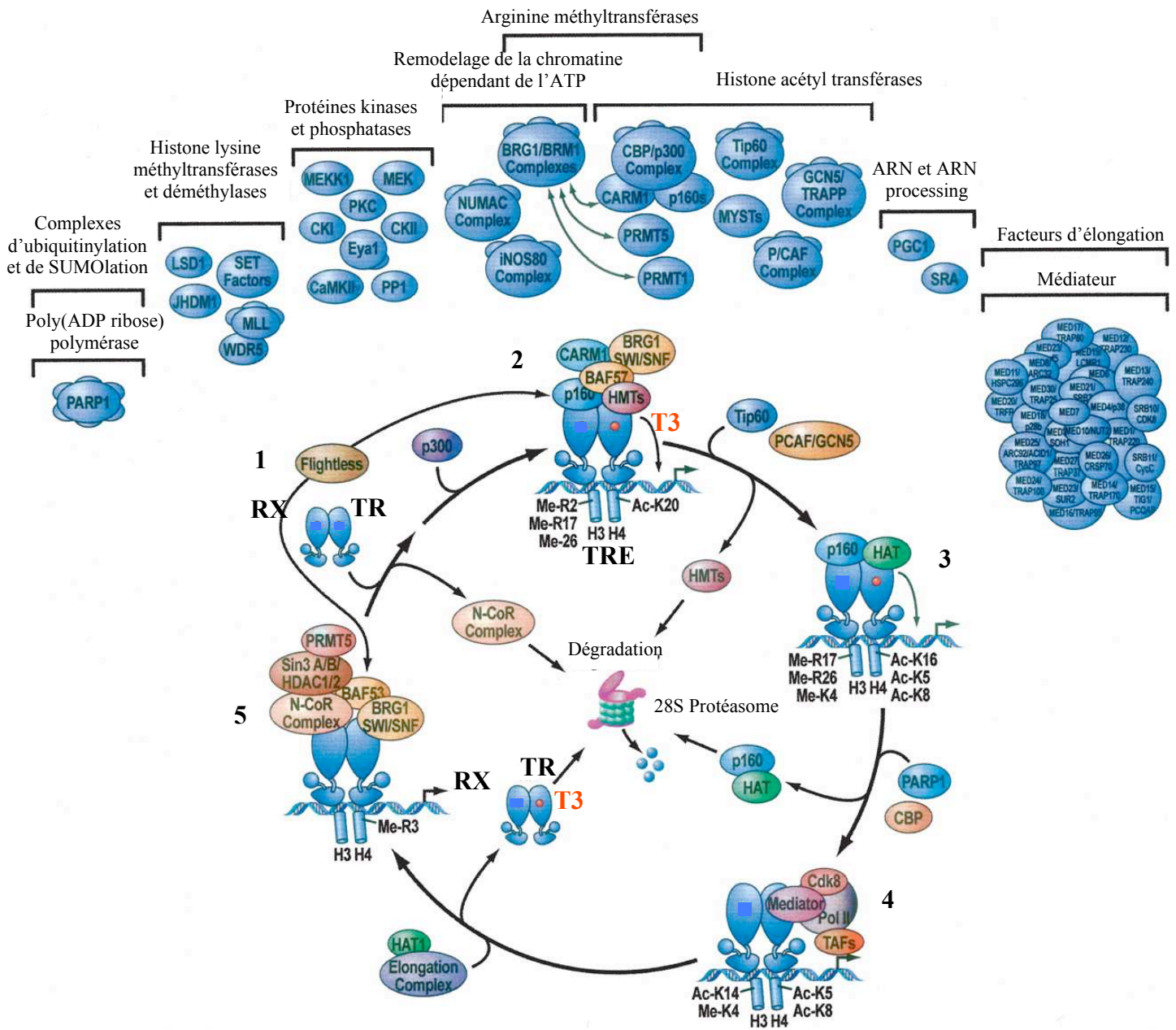


Figure 9 : Modèle de régulation transcriptionnelle cyclique médiée par TR
(adapté de Rosenfeld et al., 2006)

Ce modèle a été extrapolé à partir d'expériences réalisées sur TR et sur d'autres récepteurs nucléaires. Les hétérodimère RXR / TR se fixent sur les éléments de réponse TRE dans le promoteur des gènes-cibles (1). Lorsque T3 se lie à TR, l'hétérodimère interagit avec de nombreux coactivateurs, qui induisent des modifications post-transcriptionnelles spécifiques de la queue des histones. Des méthyltransférases (2) puis des histones acétyl-transférases (3) permettent de recruter la machinerie transcriptionnelle non spécifique (4). Le complexe RXR / TR est dégradé par le protéasome. Un autre hétérodimère RXR / TR se fixe sur le TRE et interagit avec des complexes de corépresseurs, en absence d'hormone (5), ce qui permet de réinitialiser un nouveau cycle.

Une première étude *in vivo* a suggéré l'intervention successive des complexes histones acétyltransférase puis du complexe TRAP / Mediateur (Sharma and Fondell, 2002). Les études réalisées sur le récepteur des œstrogènes ER ont été d'un grand apport. En effet, des expériences cinétiques d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré qu'ER α est recruté de façon cyclique sur le promoteur du gène-cible *pS2*. Il est dégradé à chaque cycle par le protéasome. Il recrute alternativement deux combinaisons de 46 cofacteurs, toutes les 40 minutes (Metivier et al., 2003). Ce modèle de régulation transcriptionnelle dynamique a ensuite été transposé à TR. d'une part TR est dégradé par le protéasome (Dace et al., 2000; Kenessey and Ojamaa, 2005), d'autre part, une expérience de précipitation de la chromatine montre que TR β est recruté de façon cyclique sur les *TRE* des promoteurs de *GH*, *Cyp7*, *SERCA* et *PEPCK* dans les cellules hypophysaires de rat GH3 (Liu et al., 2006a). La fixation de TR β sur ces promoteurs 1h et 4h après l'ajout de T3 est corrélée au recrutement cyclique des coactivateurs SRC1, GRIP1 et TRAP220, et de l'ARN polymérase 2, 1 à 2h après. La figure 9 présente un modèle dynamique de régulation transcriptionnelle médiée par TR. Cet aspect dynamique sera dorénavant à prendre en compte dans l'analyse du mécanisme d'action des TR *in vivo*.

b. TR n'a pas de cofacteur spécifique

L'interaction TR / coactivateurs et TR / corépresseurs dépendant de la fixation de T3 sur TR, T3 est la molécule majeure permettant de basculer de la transactivation à la transrépression de l'expression d'un gène-cible, et vice-versa. Un second niveau de contrôle peut être apporté par les cofacteurs, puisque leur interaction avec TR est requise pour transactiver ou transréprimer l'expression du gène-cible. Cependant les cofacteurs sont généralement recrutés par d'autres récepteurs nucléaires, et leur expression est souvent ubiquitaire (Leo and Chen, 2000), il est donc difficile de comprendre comment ils peuvent réguler spécifiquement l'activité des TR. Le corépresseur HAIRLESS est une exception, car il entretient des rapports privilégiés avec TR.

HAIRLESS est un corépresseur de TR, du récepteur orphelin ROR α (Moraitis et al., 2002) et du récepteur de la vitamine D, VDR (Hsieh et al., 2003). Dans une expérience

d'expression transitoire dans des cellules COS, HAIRLESS a été co-immunoprécipité avec TR et les histones déacétylées HDAC 1, 3 et 5. Il réprimerait donc la transcription en s'associant à leur activité (Potter et al., 2002). HAIRLESS est principalement exprimé dans les kératinocytes de la peau, dans lesquelles il supprime la transactivation médiée par VDR (Xie et al., 2006) et dans certaines régions du cerveau, notamment dans la couche granulaire interne du cervelet (Potter et al., 2002). Dans le cerveau uniquement, son expression est fortement induite par T3 : la protéine HAIRLESS, non détectable dans le cerveau de rats hypothyroïdiens, devient visible trois heures après administration de T3 (Potter et al., 2002). Un *TRE* a été identifié dans le promoteur, il est fonctionnel dans des cellules neuroblastiques mais non dans les kératinocytes (Engelhard and Christiano, 2004). D'autres cofacteurs sont régulés par T3 dans le cervelet post-natal : SMRT est également activé tandis que SRC1 est réprimée (Ramos and Weiss, 2006). Cependant HAIRLESS est le seul cofacteur capable de réguler l'activité de TR à un niveau supérieur à T3. Alors que les autres corépresseurs de TR sont actifs seulement en absence de T3, HAIRLESS diminue la transcription médiée par TR d'un facteur 2 en présence d'une très forte concentration de T3 (10^{-7} M) (Potter et al., 2001b). Dans le cerveau post-natal, il serait impliqué dans un mécanisme de régulation négative de l'action de T3.

Une mutation naturelle du gène *Hairless*, due à l'insertion du virus de la leucémie murine dans l'intron 6, réduit de 95% son expression. Les souris mutantes homozygotes présentent une alopécie, des anomalies de la cochlée, et une modification de la forme des cellules de Purkinje, associée à une diminution de taille de 27% (Garcia-Atares et al., 1998). Ces dernières anomalies sont également présentes chez les souris hypothyroïdiennes. Autrement dit, la délétion d'un corépresseur se traduit par un phénotype partiellement comparable à un déficit en T3 : ce résultat paradoxal n'est pas expliqué.

Alien pourrait exercer une fonction similaire à HAIRLESS. Bien qu'il soit un corépresseur de nombreux facteurs de transcription comme ceux de la famille E2F (Escher et al., 2007), Alien interagit spécifiquement avec les récepteurs nucléaires VDR (Polly et al., 2000), COUP-TF et TR (Dressel et al., 1999). Ce cofacteur active l'assemblage des nucléosomes par NAP-1 et réduit son accessibilité aux histones H3 et H4 (Eckey et al., 2007). Son expression est inductible par T3 dans le cerveau (Tenbaum et al., 2003), mais il n'existe pas encore de souris knock-out permettant de déterminer sa fonction *in vivo*.

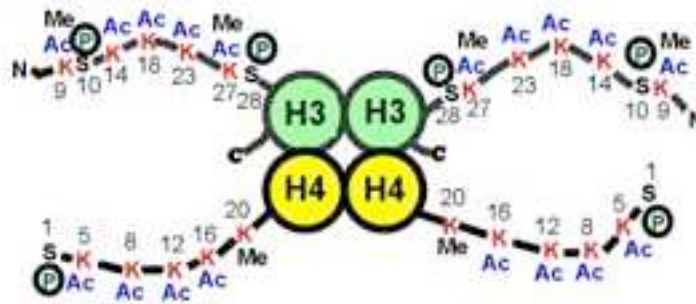
Hormis le corépresseur HAIRLESS dans le cervelet, il n'existe pas de cofacteur spécifique de TR. Dans ce cas, pourquoi tous les récepteurs nucléaires ne sont-ils pas activés en même temps, lorsque leurs ligands respectifs sont présents ? L'explication peut être que les récepteurs ont plus d'affinités pour certains cofacteurs que pour d'autres. Par exemple, Cohen et al. (Cohen et al., 2001) ont montré que TR β 1 interagit plus fortement avec la boîte N2 de NCOR qu'avec la boîte analogue S2 de SMRT. Au contraire, le récepteur de l'acide rétinoïque RAR α a plus d'affinité pour la boîte S2 de SMRT. Les résidus flanquant les boîtes RN et CoRRN ont un rôle prépondérant : par exemple la sérine 884, adjacente au motif LXXLL du coactivateur TRBP (TR Binding Protein), est responsable de la sélectivité d'interaction TRBP / ER α versus TRBP / TR, TRBP / RXR et TRBP / ER β (Ko et al., 2002). Une quantification précise des affinités d'interaction entre TR et de nombreux cofacteurs a été réalisée par une approche de protéomique quantitative (Moore et al., 2004). Il faudrait maintenant comparer ces affinités avec celles d'autres récepteurs nucléaires, afin de montrer que, dans la même cellule, le panel de cofacteurs recruté dépend du récepteur nucléaire.

Le mécanisme permettant à une interaction spécifique TR / cofacteurs de réguler l'activité des TR sur le promoteur d'un gène-cible est aujourd'hui mieux compris, nous l'exposerons brièvement.

c. La spécificité d'action des TR s'expliquerait par le code des histones

Les séquences *TRE* sont soumises au mécanisme dynamique de condensation / décondensation de la chromatine. L'ADN est organisé autour d'octamères d'histones, les nucléosomes. Les queues des histones, c'est-à-dire les domaines N-terminaux dépassant des nucléosomes, subissent des modifications post-traductionnelles. Auparavant, l'acétylation globale des histones était associée à l'activation de la transcription, la déacétylation à la répression. Ces modifications sont en fait plus complexes : elles comprennent des phosphorylations, des méthylations, des ubiquitinations et des sumoylations, ainsi qu'une acétylation ou désacétylation ciblées de certains résidus. Le patron de modification des histones est corrélé à l'état de condensation / décondensation de la chromatine et à l'état transcriptionnel local des gènes (Jenuwein and Allis, 2001).

Queue des histones H3 et H4 :



Immunoprécipitation de la chromatine d'ovocyte de Xénope

Anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation :

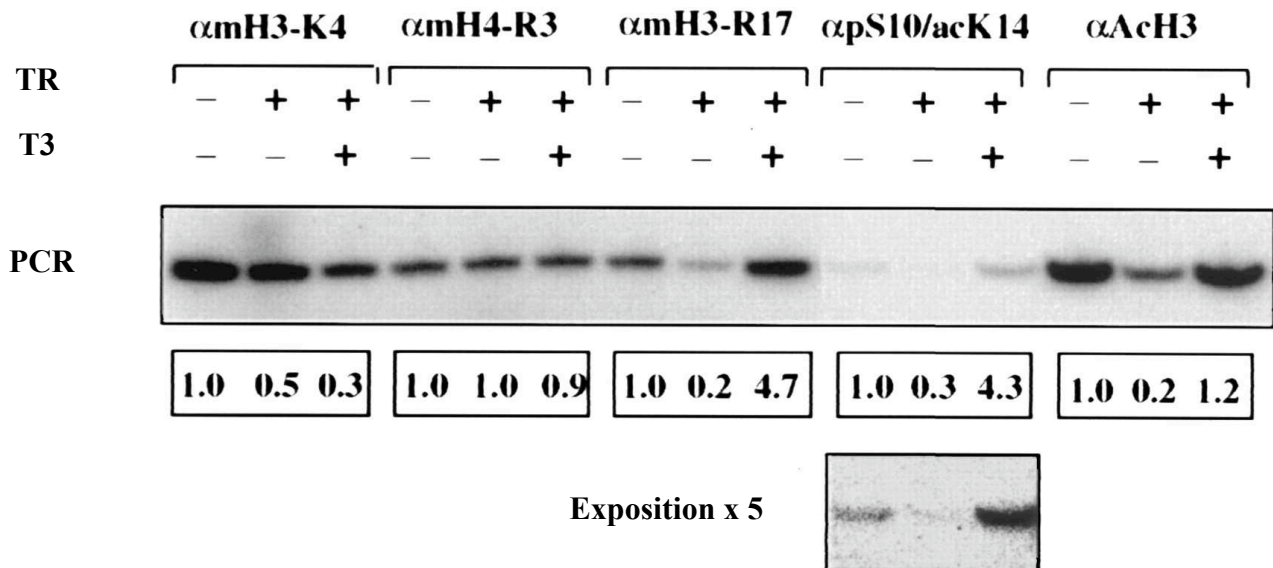


Figure 10 : Modifications post-traductionnelles de la queue des histones induites par la fixation de T3 sur TR
(Li et al., 2002)

Une expérience d'immuno-précipitation de la chromatine d'oocytes de Xénope montre que la transrépression médiée par TR est associée à des modifications de la queue de l'histone H3 : une augmentation de la méthylation de la lysine 9, et une diminution de la méthylation de la lysine 4 et de l'arginine 17, de la phosphorylation de la sérine 10 et de l'acétylation de la lysine 14. La transactivation médiée par TR, au contraire, est associée à une diminution de la méthylation de la lysine 4 et 9, et à une forte augmentation de la méthylation de l'arginine 17, de la phosphorylation de la sérine 10 et de l'acétylation de la lysine 14.

Par immunoprécipitation de la chromatine d'oocytes de Xénope, Li et al. (Li et al., 2002) ont montré que la transrépression médiée par TR est associée à des modifications de l'histone H3 (Figure 10) : une augmentation de la méthylation de la lysine 9, et une diminution de la méthylation de la lysine 4 et de l'arginine 17, de la phosphorylation de la sérine 10 et de l'acétylation de la lysine 14. La transactivation médiée par TR, au contraire, est associée à une diminution de la méthylation de la lysine 4 et 9, et à une forte augmentation de la méthylation de l'arginine 17, de la phosphorylation de la sérine 10 et de l'acétylation de la lysine 14. Ces modifications semblent spécifiques d'un récepteur nucléaire. En effet, la transactivation médiée par le récepteur des œstrogènes ER et le récepteur des glucocorticoïdes GR sur un même élément de réponse HRE aboutit à deux patrons différents de modification des histones (Li et al., 2003). Ces modifications seraient d'une part une mémoire de la voie hormonale activée et elles transmettraient également une information spécifique, en contrôlant la transcription en aval : c'est la notion révolutionnaire de « Code des histones » (Jenuwein and Allis, 2001).

Grâce à une technique de co-immunoprécipitation de la chromatine, une étude menée sur les récepteurs de la progestérone PR et le récepteur des glucocorticoïdes GR (Li et al., 2003), a permis de comprendre comment le code des histones est mis en place. Lorsque PR et GR agissent sur le même élément de réponse HRE, ils interagissent tous les deux avec le coactivateur pCIP. Par contre, seul PR interagit avec SRC1 et CBP. La lysine 5 de l'histone H4 est alors spécifiquement acétylée par CBP. GR interagit lui avec TIF2 et PCAF. La lysine 14 est alors spécifiquement acétylée par PCAF, et la sérine 10 de l'histone H3 est phosphorylée. Le patron de modification des histones résulte donc d'une différence d'affinité d'interaction récepteur nucléaire / cofacteur.

La modification d'un résidu d'histone provoque ensuite d'autres modifications. Lors de la transactivation médiée par le récepteur des œstrogènes, l'acétylation des lysines 18 et 23 de H3 par CBP favorise la méthylation de l'arginine 17 par CARM-1 (Daujat et al., 2002). Concernant TR, l'action acétyl-transférase des cofacteurs de la famille SRC et p300 est nécessaire pour le recrutement du complexe TRAP, qui interagit fortement avec les résidus acétylés de la queue des histones (Sharma and Fondell, 2002). Ainsi les modifications des histones créent des sites d'interaction avec des protéines de la machinerie transcriptionnelle non spécifique, comme le complexe TRAP.

De nouveaux cofacteurs impliqués dans le code des histones sont identifiés chaque jour. La découverte de déméthylases (Shi et al., 2004) Tsukada et al., 2006

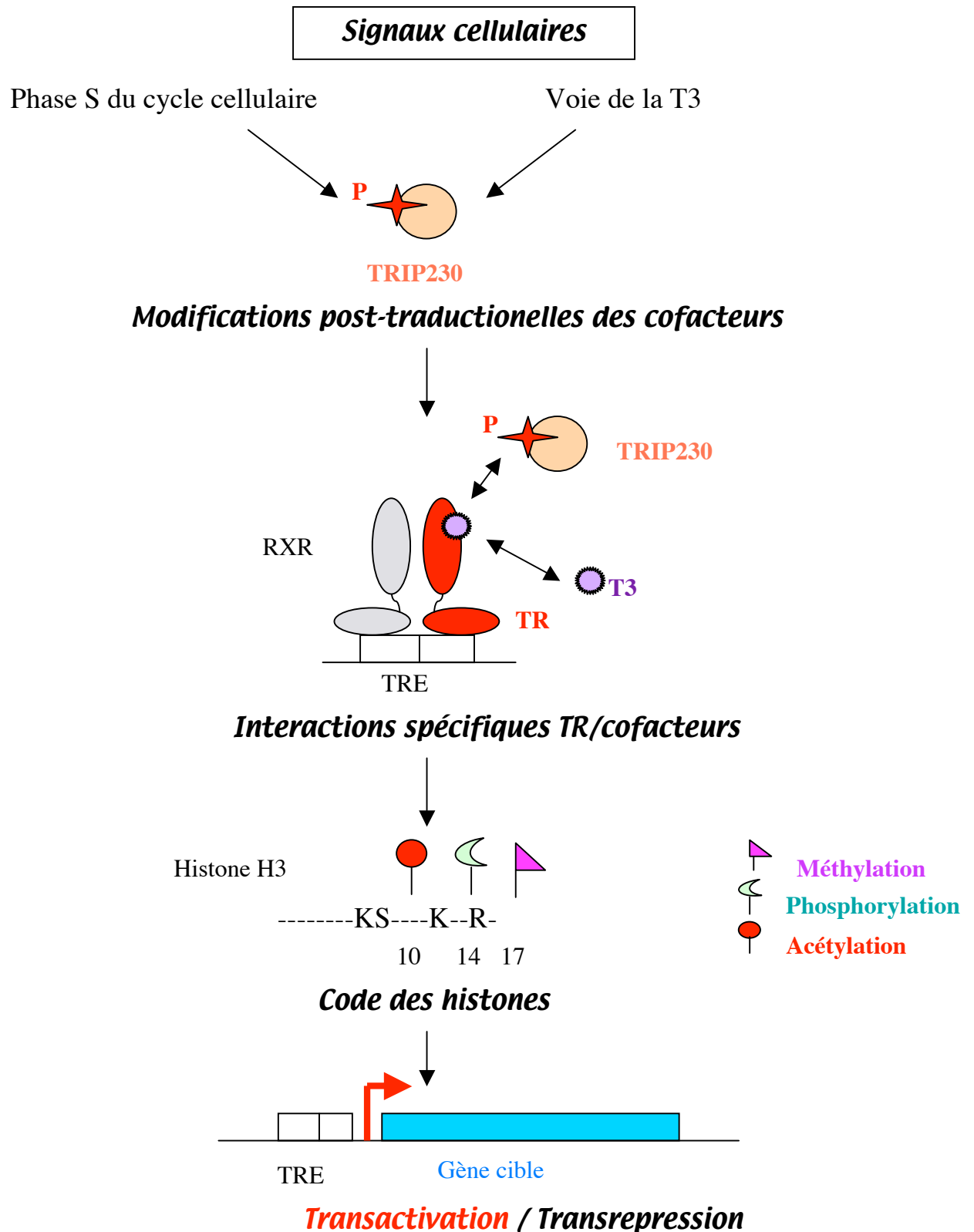


Figure 11 : Rôle des cofacteurs dans la spécificité d'action des TR

Les cofacteurs, par exemple TRIP230, sont des médiateurs qui centralisent des informations issues de différentes voies de signalisation, *via* des modifications post-traductionnelles, par exemple une phosphorylation. Par l'intermédiaire d'une interaction moléculaire spécifique avec TR, ils traduisent cette information en un code des histones. Ce code dirige ensuite le niveau d'expression du gène-cible.

Yamane et al., 2006) a notamment résolu l'énigme posée par la disparition rapide de la méthylation des histones. Comme le récepteur des androgènes qui interagit avec LSD1 (Metzger et al., 2005) et JMD2C (Wissmann et al., 2007) pour supprimer les marques de mono, di et triméthylation, TR doit lui aussi recruter des déméthylases.

Par l'intermédiaire d'une interaction moléculaire spécifique avec TR, les cofacteurs génèrent donc un code des histones spécifique, qui contrôle ensuite la transcription du gène-cible.

d. Les cofacteurs intègrent de nombreux signaux cellulaires

Le complexe allostérique TR / cofacteur a une activité modifiée par différents signaux cellulaires, ce qui sera illustré par deux exemples.

Une étude biochimique sur des extraits nucléaires de cellules Hela a montré que le complexe TR / corépresseur (NCoR, SMRT, TBL1 et HDAC3) est associé à un complexe de kinases dont l'activité dépend de l'ADN (DNA-PK), contenant notamment la sous-unité catalytique de la DNA-PKcs, membre de la voie PI3 kinase. Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine a confirmé que ce complexe est recruté sur le promoteur de *GH*, gène-cible de T3. Sur un complexe purifié, la DNA-PKcs est capable de phosphoryler HDAC3 en présence d'ATP, ce qui augmente son activité histone déacétylase. L'activation de la voie PI3 kinase dans une cellule peut donc favoriser l'établissement d'une chromatine répressive sur un promoteur cible de TR (Jeyakumar et al., 2007).

Dans des cellules CV-1, le coactivateur TRIP230 est détecté dans l'appareil de Golgi pendant l'interphase (Chen et al., 1999). Pendant la phase S, il est phosphorylé et partiellement transporté dans le noyau. L'interaction TR / TRIP230 est donc régulée par le cycle cellulaire. Pendant l'interphase, l'addition de T3 dans le milieu de culture provoque en une heure la translocation de TRIP230 phosphorylé de l'appareil de Golgi vers le noyau. Trip230 est alors colocalisé avec TR dans le noyau. Ainsi, l'interaction TR / TRIP230 pourrait également être régulée par la voie de la T3. Des signaux issus de différentes voies de signalisation modifient donc l'interaction TR / TRIP230, ce influence l'activité transcriptionnelle de TR (figure 11).

Outre l'importance du ligand dans la fonction de TR, ces exemples montrent que le récepteur fonctionne comme un carrefour moléculaire vers lequel convergent des signaux hormonaux et non hormonaux pour générer une régulation combinatoire de l'expression des gènes-cibles. Les cofacteurs comme TRIP230 et HDAC3 sont les médiateurs d'une interaction entre la voie de la T3 et d'autres voies de signalisation. Ils agiraient comme des senseurs ou des adaptateurs moléculaires en intégrant les réponses transcriptionnelles à l'échelle moléculaire (Rosenfeld et al., 2006). La signalisation de T3 n'est donc pas seulement une activité dépendante du ligand, elle s'inscrit dans un grand réseau de régulation transcriptionnelle.

Ces interactions moléculaires complexes peuvent expliquer pourquoi la signalisation de T3 est activée ou non dans une cellule donnée, à un moment donné du développement. Cependant, elles n'expliquent pas pourquoi TR est actif sur certains *TRE* et non sur d'autres dans une même cellule.

C. Régulation de l'expression d'un gène-cible

a. Spécificité des TRE

La recherche bioinformatique des *DR4* et *ER6* à proximité du site de démarrage de la transcription est une méthode intéressante pour identifier des *TRE*. Cependant de nombreux *TRE* naturels ne correspondent pas à ces séquences consensus (Desvergne, 1994) — un certain nombre par exemple contiennent plus de deux motifs. Or TR β peut se fixer à l'ADN sous forme de trimères sur des éléments de réponse naturels formés de plusieurs motifs (Mengeling et al., 2005). De plus, les *TRE* ne se situent pas nécessairement dans le promoteur ou les introns des gènes-cibles, à quelques kb du site de démarrage de la transcription. Comme le récepteur des oestrogènes ER et le récepteur des androgènes AR, capables de se fixer à plus de 100 kb d'une séquence codante connue (Carroll et al., 2006) — Takayama et al., 2007), TR pourrait se fixer à grande distance du site de démarrage de la transcription, voire réguler l'expression de régions non codantes mais potentiellement transcrites (Cheng et al., 2005). Ceci rend toute prédiction *in silico* difficile. Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine à l'échelle du génome révélerait sans doute un très grand nombre de fixation des TR dans le génome, comme cela a été observé pour ER (Carroll et al., 2006). Dans ce cas,

n'importe quel gène pourrait potentiellement devenir un gène-cible de TR, tout dépendrait alors de l'accessibilité de son promoteur. Il faudrait donc l'intervention préalable d'un ou plusieurs facteurs capables d'ouvrir la chromatine.

Dans une cellule, l'accessibilité locale de TR à la chromatine peut expliquer qu'un gène-cible ne soit pas activé par T3. Réciproquement, les éléments de réponse pourraient posséder une information intrinsèque les rendant capables de diriger le recrutement de cofacteurs spécifiques de TR sur leur promoteur. Par exemple, chez le Xénope, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré qu'en absence de T3, tous les *TRE* des différents gènes-cibles sont occupés par le corépresseur NCOR alors que les *TRE* de *TH /bZIP* et ceux de *THRB* sont les seuls à être occupés par le corépresseur RDP3 (Havis et al., 2003). De même, dans les cellules GH3 de l'hypophyse de rat, TR lié à T3 recrute une combinaison différente de cofacteurs sur les *TRE* de *GH*, *Cyp7* et *PEPCK*, ce qui induit des modifications d'histones différentes (Liu et al., 2006a). Comme ces expériences ont été réalisées à un moment donné, il n'est pas exclu que les cycles de transcriptions sur les différents *TRE* soient seulement décalés dans le temps. Une cinétique fine permettrait de répondre à cette question.

Si ce n'est pas le cas, comment un élément de réponse peut-il spécifier le recrutement de certains cofacteurs ? En l'absence de données pour TR, nous raisonnerons par analogie avec d'autres récepteurs nucléaires. Les interactions du récepteur des glucocorticoïdes GR et du coactivateur TIF2 ont été caractérisées sur deux éléments de réponse aux glucocorticoïdes *GRE* dans les cellules U2OS (Rogatsky et al., 2002). Sur le *GRE* de la collagénase 3, l'activité corépressive de TIF2 est due aux résidus 765 à 1007. Sur le *GRE* de l'ostéocalcine, ce domaine n'est pas impliqué. Les *GRE* influencent donc la conformation moléculaire du complexe régulant la transcription, par exemple en dictant l'orientation de la surface de dimérisation de GR (Lefstin and Yamamoto, 1998). Les éléments de réponse pourraient donc spécifier les interactions récepteurs nucléaires / cofacteurs.

b. Spécificité des isoformes de TR recrutées sur un TRE

L'action de T3 sur les *TRE* pourrait également être régulée par une isoforme spécifique de TR, comme cela a été observé pour l'action des glucocorticoïdes sur les *GRE*. En effet, de

nombreuses isoformes de GR sont produites par épissage et initiation de la traduction alternatifs et elles sont sujettes à diverses modifications post-traductionnelles (Duma et al., 2006). Ces multiples isoformes présentent des patrons d'expression et des profils de régulation transcriptionnelle spécifiques, ce qui suggère que dans une cellule la combinaison de ces isoformes peut déterminer la spécificité tissulaire des glucocorticoïdes (Lu and Cidlowski, 2006). Concernant TR, une analyse du transcriptome par puce à ADN a montré que dans le foie certains gènes-cibles sont sensibles à la délétion de *THRB* et non à la délétion de *THRA* (Yen et al., 2003). Cependant ceci peut-être simplement dû à l'expression majoritaire de *THRB* dans le foie (Schwartz et al., 1992). De façon générale, la régulation d'un gène-cible par une isoforme spécifique peut s'expliquer uniquement par l'expression majoritaire de cette isoforme dans la cellule-cible. Ainsi le rôle prépondérant de TR β 2 sur l'audition s'explique par son expression spécifique dans les cellules ciliées de la cochlée, sous le contrôle du promoteur de *THRB*. Son rôle prépondérant sur la vision et la régulation de l'axe thyroïdien s'explique par son expression spécifique respectivement dans les cônes immatures et les cellules thyroïdiques de l'hypophyse, sous le contrôle d'une région intronique complexe (Jones et al., 2007).

Une seule isoforme de TR peut également être activée dans la cellule-cible, si cette isoforme recrute sélectivement certains cofacteurs. Par exemple TR β 2 diffère de TR β 1 dans son domaine N-terminal, or ce domaine présente une activité transcriptionnelle dépendante du ligand plus forte que TR α 1 et TR β 1. Récemment il a été montré que seul le domaine A/B de TR β 2 interagit avec les coactivateurs CBP (CREB BINDING PROTEIN) et NRC (NUCLEAR RECEPTOR COACTIVATOR) (Tian et al., 2006). Ces interactions pourraient expliquer que TR β 2 soit actif dans une cellule alors que TR β 1 ne l'est pas. Les cofacteurs peuvent également favoriser l'expression d'une isoforme : le coactivateur PGC-1, qui possède un domaine impliqué dans l'épissage des ARN, réduit directement l'expression de TR α 1 en faveur de TR α 2 (Thijssen-Timmer et al., 2006).

A l'heure actuelle, il est difficile de savoir si des *TRE* pourraient interagir préférentiellement avec une isoforme de TR de part leur séquence ou leur conformation moléculaire. Sur un grand nombre de *TRE*, une redondance fonctionnelle entre les différents TR est couramment observée *in vitro*, dans les expériences d'expression transitoire. De même *in vivo*, certains gènes-cibles de T3 ne sont pas dérégulés dans les simples knock-out *THRA*

ou *THRB*, mais uniquement dans les doubles knock-out (Golozoubova et al., 2004 □ Mansen et al., 2001 □ Kindblom et al., 2005). Une exception existe : dans les cellules ciliées externes de la cochlée, qui expriment à la fois *THRA* et *THRB*, l'expression de la *Prestin* est activée par TR β tandis que l'expression de *KCNQ4* est activée par TR α 1 (Winter et al., 2006). C'est la première observation de *TRE* spécifiquement activés par l'un des deux TR alors que les deux sont présents dans la cellule. La différence de conformation moléculaire des récepteurs pourrait être impliquée.

En résumé, le ligand, les nombreux cofacteurs, les isoformes de TR et la nature du *TRE* régulent conjointement l'activité de TR si bien qu'il est difficile de prédire quel gène-cible sera activé.

D. Les TR interviennent dans des régulations croisées

Outre leur rôle direct dans la régulation de la transcription des gènes-cibles de T3, les TR interviennent dans de nombreuses régulations croisées avec d'autres voies de signalisation. Etant donné leur nombre, nous n'aborderons pas les interactions protéiques observées entre TR et d'autres facteurs de transcription *in vitro* (Flamant et al., 2007), nous développerons seulement quelques exemples de régulations croisées entre TR et d'autres récepteurs nucléaires, qui ont été confirmées chez la souris.

a. Effet coopératif

Un premier mécanisme conduisant à l'interaction de deux voies de signalisation repose sur une régulation du niveau d'expression d'un récepteur nucléaire par un autre. Par exemple, l'expression du récepteur orphelin *ROR α* est activé de 3 fois par l'administration de T3 et de T4 à une souris hypothyroïdienne (Koibuchi and Chin, 1998), tandis qu'elle est réprimée dans le cervelet hypothyroïdien à P15 (Koibuchi et al., 2001) et dérégulée dans différents noyaux sous thalamiques chez les souris adultes totalement dépourvues de TR (Vasudevan et al., 2005). Cependant seule une expérience restaurant l'expression de *ROR α* permettrait de montrer l'implication du récepteur orphelin dans leur phénotype.

Les souris *Staggerer*, mutants naturels de *RORα*, présentent quant à elles un développement anormal du cervelet. Comme les niveaux d'expression de *BDNF*, *NT-3* et *NT-4/5*, des gènes-cibles de T3, sont diminués, l'effet de la mutation sur la signalisation de TR a été exploré *in vitro*. Alors que le *RORα* sauvage augmente l'activité de TRα1 / TRβ1 sur différents *TRE*, le *ROR* mutant n'a pas d'activité. Le phénotype cérébelleux des souris *Staggerer* semble donc partiellement dû à une perturbation de la signalisation de TR (Qiu et al., 2007). Cette étude montre un effet coopératif physiologique entre deux récepteurs nucléaires.

b. Compétition de liaison sur un DR4

Un second mécanisme consiste en une compétition fonctionnelle avec d'autres récepteurs nucléaires pour se fixer sur les éléments de réponse. En effet, le récepteur des oxystérols LXR et le récepteur des acides biliaires FXR se fixent également sur des *DR4* (Aranda and Pascual, 2001). TR peut donc entrer en compétition avec eux (Kawai et al., 2004□Berkenstam et al., 2004□Araki et al., 2005a).

L'hypercholestérolémie est un symptôme d'hypothyroïdie. De façon surprenante, les souris possédant une mutation ponctuelle de *THRB* (*TRβ^{Δ337T}*) qui abolit la liaison à T3 (Hashimoto et al., 2001b), sont au contraire protégées de l'hypercholestérolémie induite par le régime alimentaire, en raison de l'augmentation du métabolisme hépatique du cholestérol (Hashimoto et al., 2006b). *CYP7A1*, un gène pourtant directement réprimé lors d'hypothyroïdie (Ness et al., 1990), est activé dans le foie de ces souris. Comme c'est également un gène-cible de LXRα (Peet et al., 1998), des expériences d'expression transitoire ont été réalisées pour étudier les interactions des deux récepteurs sur le *DR4* présent dans son promoteur. L'expression de TRβ sauvage antagonise l'action de LXRα, mais pas celle de TRβΔ337T. Une expérience de retard de migration sur gel montre que les complexes TRβ / RXRα sont préférentiellement fixés sur le *DR4* par rapport aux complexes LXRα / RXRα, mais le complexe TRβΔ337T / RXRα est un compétiteur moins fort. Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine confirme que le *DR4* de *CYP7A1* est principalement occupé par les hétérodimères TR / RXR dans le foie des souris sauvages, tandis qu'il est occupé par LXR / RXR dans le foie des souris mutantes (Hashimoto et al., 2006b). Le

phénotype paradoxal des mutants s'expliquerait donc par la perte d'une régulation croisée physiologique entre TR β et LXR α .

Réciproquement, les souris *LXR α ^{-/-} LXR β ^{-/-}* sont résistantes à l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisse. L'expression ectopique de la protéine découplante mitochondriale UCP1 dans le muscle et les adipocytes blancs entraîne une dissipation anormale de l'énergie (Kalaany et al., 2005). Par un mécanisme inconnu, la D2 est anormalement exprimée dans le foie de ces souris, où elle convertit une grande quantité de T4 en T3. Or T3 est connue pour activer l'expression d'*UCP1* (Reitman et al., 1999). L'introductions des allèles nuls de *THRA* et *THRB* dans ces souris *LXR α ^{-/-} LXR β ^{-/-}* permettrait de mesurer l'implication de TR dans leur phénotype.

c. Fixation de TR sur les éléments de réponse d'autres récepteurs nucléaires

Les TR peuvent également se fixer sur les éléments de réponse d'autres récepteurs nucléaires. L'action des TR sur la signalisation de PPAR est aujourd'hui bien documentée. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine montrent que TR β se fixe sur les éléments de réponse de PPAR γ (*PPRE*) présents dans le promoteur de la lipoprotéine lipase et, en absence de T3, recrute des corépresseurs. Cette répression croisée disparaît lorsque T3 se fixe sur TR β . Cependant, elle persiste de façon anormale quand le récepteur TR β possède la mutation PV qui décale le cadre de lecture des 14 derniers acides aminés, élimine le domaine de transactivation AF-2 et réduit l'affinité pour le ligand (Araki et al., 2005b). Dans le cœur, la mutation ponctuelle $\Delta 337T$, qui abolit la fixation de T3, a un effet similaire sur les gènes-cibles de PPAR α (Buroker et al., 2007).

Deux mutations différentes de *THRA* qui réduisent l'affinité de TR $\alpha 1$ pour T3 sont responsables à l'âge adulte d'un phénotype métabolique opposé : la mutation PV réduit la masse de tissu adipeux (Ying et al., 2007) tandis que la mutation P398H l'augmente (Liu et al., 2003). L'effet dominant négatif de TR $\alpha 1$ PV sur la signalisation de PPAR γ dans le tissu adipeux brun expliquerait que les souris mutantes *TR $\alpha 1$ ^{PV/+}* soient maigres (Ying et al., 2007). L'effet dominant négatif de TR $\alpha 1$ P398H, sur la signalisation de PPAR α dans le foie entraînerait une stéatose hépatique expliquant l'obésité des souris *TR $\alpha 1$ ^{P398H/+}* (Liu et al.,

2006b). Les deux récepteurs PPAR sont connus pour avoir une action opposée□ PPAR α stimule l'oxydation des acides gras dans le foie tandis que PPAR γ active le stockage des acides gras dans le tissu adipeux blanc (Ferre, 2004). Cependant, il est surprenant que chacune des mutations de TR α 1 dérèglent spécifiquement l'activité d'un PPAR plutôt que de l'autre et permette d'expliquer deux phénotypes radicalement opposés.

Ces mutations ont donc été comparées à l'aide d'un gène rapporteur *PPRE*–*Luciférase*□ la mutation P398H réduit trois fois plus que la mutation PV la transactivation médiée par PPAR α . Des expériences de retard de migration sur gel montrent également que TR α 1P398H se lie avec plus d'affinité que TR α 1PV sur le *PPRE* de *CPT-I α* (Liu et al., 2007). Si TR α 1P398H a une action antagoniste plus forte que TR α 1PV sur la signalisation de PPAR α , il faudrait vérifier que TR α 1PV a quant à lui une action antagoniste plus forte sur la signalisation de PPAR γ .

TR peut également se fixer sur des éléments de réponse du récepteur des oestrogènes *ERE*. L'influence de T3 sur l'action des oestrogènes a été démontrée *in vivo* : l'administration de T3 réduit par exemple le comportement de lordose de la souris (Morgan et al., 2000). Cet effet est médié par TR α 1 dont la délétion réduit ce comportement sexuel. Au contraire la délétion de TR β a la conséquence inverse (Dellovade et al., 2000). L'injection de T3 à des femelles traitées aux oestrogènes diminue l'expression de l'ocytocine dans les neurones de l'hypothalamus (Dellovade et al., 1999). Dans le promoteur humain de l'ocytocine, TR α 1 se fixerait sur un élément de réponse composite contenant un *ERE* imparfait (Adan et al., 1992). Mais la compétition de liaison aux *ERE* n'est pas un mécanisme universel. En effet, T3 réprime l'expression d'un autre gène-cible d'ER, la *Préproenképhaline PPE*, et ce même si TR α 1 présente une mutation qui abolit sa capacité à lier l'ADN. Les effets de TR sur la transactivation médiée par ER sont en fait spécifiques selon le type cellulaire, les isoformes de ER et TR et le promoteur impliqués (Vasudevan et al., 2002). Certaines de ces interactions moléculaires pourraient expliquer comment T3 agit pour limiter la saison de reproduction dans certaines espèces (cf. I. C. e).

d. Régulations indirectes

Enfin, certaines régulations croisées n'impliquent pas d'interaction directe entre les deux récepteurs. Par exemple TR influence indirectement la voie du récepteur de l'acide rétinoïque RAR en régulant l'expression de la protéine de liaison de l'acide rétinoïque CRABP1 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1). Cette protéine cytoplasmique régule la signalisation de RAR en modulant la concentration d'acide rétinoïque libre dans une cellule (Wei et al., 1999). *CRABP1* est un gène-cible de T3, régulé par la fixation de TR sur un *TRE* situé 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription (Chang and Wei, 1997). Ce *TRE* est associé physiquement avec la boîte GC du promoteur basal. Une boucle de l'ADN pourrait permettre de juxtaposer ces deux segments de la chromatine, espacés de 1 kb. La boîte GC est constitutivement occupée par SP1 et le complexe Médiateur. T3 induit une interaction directe de TR avec le facteur de transcription SP1, le coactivateur TRAP220 du complexe Médiateur permettant de stabiliser le complexe. Cette interaction est associée à un mécanisme de remodelage de la chromatine atypique, qui permet à l'ARN polymérase II d'accéder au site d'initiation de la transcription (Park et al., 2005).

Ces exemples de régulations croisées montrent que l'action des TR s'inscrit dans un véritable réseau transcriptionnel de récepteurs nucléaires. De tels réseaux seraient impliqués dans la réalisation des grandes fonctions physiologiques : reproduction, développement, croissance, nutrition, métabolisme, excrétion (Bookout et al., 2006). Il est tentant d'intégrer les voies de signalisation à une échelle supérieure, afin de mettre en lumière une intelligence collective. Bookout et al. (Bookout et al., 2006) ont récemment tenté de le faire à partir du patron d'expression des récepteurs nucléaires. Ces données étant essentiellement descriptives, il serait particulièrement intéressant de hiérarchiser les acteurs et d'identifier les redondances fonctionnelles entre les différents récepteurs nucléaires, en croisant notamment les différentes lignées de souris mutantes.

Les régulations croisées compliquent le mécanisme d'action des TR. Cependant, elles s'intègrent dans le modèle classique, ce qui n'est pas le cas pour les effets de TR présentées dans la partie suivante, pour lesquels il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle.

E. Les limites du modèle classique

a. La régulation négative

Le modèle classique de transactivation dépendante du ligand n'explique pas que de nombreux gènes-cibles de TR soient réprimés en présence de T3. En effet, une analyse transcriptomique révèle que dans le foie, sur 56 gènes régulés par T3, 14 sont activés tandis que 42 sont réprimés (Yen et al., 2003). De façon réciproque, les TR non liés à T3 activent la transcription de certains gènes (Jho et al., 2005 □ Miller et al., 2004). Pour le récepteur à l'acide rétinoïque, il a été montré que la régulation positive ou négative est fortement influencée par le nombre de nucléotides qui sépare les répétitions directes du motif fixant les hétérodimères RAR / RXR (Kurokawa et al., 1994). Mais l'existence d'éléments de réponse «négatifs» n'a pas été clairement démontrée *in vivo* pour TR.

Les régulations négatives de l'expression de *TRH*, *TSH α* et de *TSH β* ont été les plus étudiées. Les modèles de souris modifiées génétiquement ont apporté quelques éclaircissements (Flamant et al., 2006a). Les souris *TR β 2^{-/-}* présentent une forte augmentation du niveau sérique de TSH (Ng et al., 2001b □ Abel et al., 1999b) et de TRH (Abel et al., 1999a), ce qui met en lumière l'implication de cette isoforme. Cependant, ces mutants constitutifs ne sont pas encore le meilleur modèle pour étudier la régulation négative exercée par TR β 2 sur l'expression de *TSH α* et *TSH β* dans l'hypophyse. En effet, le niveau de TSH peut être affecté de façon indirecte, car TR β est également nécessaire à la régulation négative de TRH (Nikrodhanond et al., 2006) et au fonctionnement normal de l'hypophyse (Furumoto et al., 2005). La délétion de *TRH* chez les souris TR β ^{-/-} normalise le niveau de TSH, ce qui montre que TRH est en fait le régulateur principal de l'expression de *TSH α* et de *TSH β* (Nikrodhanond et al., 2006).

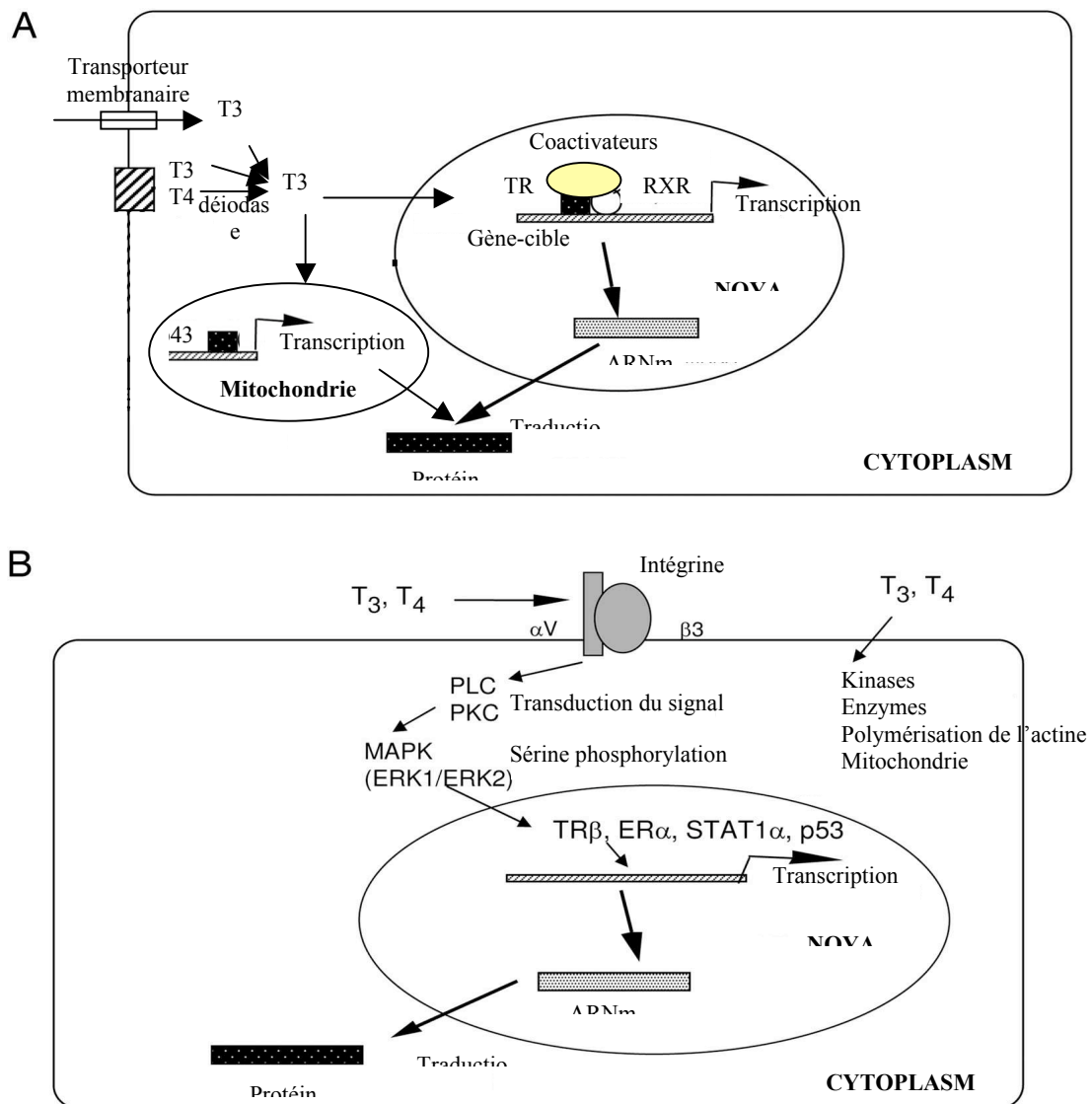
Malgré les limites des modèles utilisés, ils ont permis de montrer que la régulation négative ne résulte pas de l'activation de *TSH α* et de *TSH β* par les TR non liés à T3, puisque les souris totalement dépourvues de TR ont des niveaux de TSH très élevés (Gothé et al., 1999 □ Gauthier et al., 1999). Elle résulte donc de la répression de *TSH α* et de *TSH β* par les TR liés à T3. Une mutation du domaine de liaison à l'ADN de TR β abroge cette régulation négative (Shibusawa et al., 2003a). La fixation sur l'ADN est donc requise, ce qui n'est pas la preuve qu'un élément de réponse négatif soit impliqué. Dans des cellules CV1, la présence du *TRE* négatif putatif (Sasaki et al., 1999) n'est pas nécessaire à la répression de *TSH β* par TR /

T3 (Matsushita et al., 2007). Les auteurs ayant observé que la coexpression de Pit1, GATA2, et TR induit une répression de *TSHβ* dépendante de T3 (Nakano et al., 2004), ils suggèrent un mécanisme de régulation croisé entre TR et GATA2. Cependant le mécanisme observé dans ces cellules CV1 peut être complètement artificiel. Pour réellement prouver que l'élément de réponse négatif n'est pas impliqué, il faudrait générer des souris dans lesquelles cet élément a été muté.

L'étude des souris transgéniques a démontré que TRβ2 a besoin de recruter les coactivateurs pour réprimer l'expression de *TSHα* et de *TSHβ*. D'une part la mutation E457A en abolissant les interactions de TRβ avec les coactivateurs dérégule l'expression de *TSHα* et *TSHβ* (Ortiga-Carvalho et al., 2005). D'autre part, la délétion des coactivateur SRC1 (Weiss et al., 1999) ou TIF2 (Weiss et al., 2002), entraîne une augmentation du niveau de TSH. En présence de T3, TRβ2 recruterait donc des histones acétylases sur les promoteurs de *TSHα* et *TSHβ* pour réprimer leur expression. Depuis la théorie du code des histones (Jenuwein and Allis, 2001), l'acétylation de certains résidus n'est plus incompatible avec la répression transcriptionnelle. Cependant, dans les cellules TαT1, une lignée thyrotrophe, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine montre que la répression exercée par T3 sur l'expression de *TSHβ* s'accompagne d'une dissociation du coactivateur TRAP220 et d'une réduction transitoire de l'acétylation de l'histone 4 (Matsushita et al., 2007). Les modifications potentielles de tous les résidus de la queue des histones doivent donc être déterminées sur le promoteur de *TSHβ* *in vivo*, en présence ou non de T3, afin de proposer un mécanisme moléculaire crédible de régulation négative.

b. Les effets non génomiques

Dans des astrocytes cultivés en absence de T3, Leonard et al. ont été les premiers à mettre en évidence une désorganisation du cytosquelette d'actine qui peut être corrigée en 20 minutes par l'addition de T4 (Leonard et al., 1990). Cet effet a été également observé dans des ostéoblastes hypothyroïdiens (Banovac and Koren, 2000), durant l'allongement des neurites des neurones cérébelleux (Farwell et al., 2005) et dans les cellules somatotropes (Goulart da Silva et al., 2006). Ces réponses très rapides ont suggéré une action indépendante de toute transcription et de toute synthèse protéique. Aujourd'hui il existe un nombre croissant



PLC = Phospholipase C

STAT1α = Signal Transducteur et Activateur de la Transcription 1 α

PKC = Protéine Kinase C

ERα = Récepteur des oestrogènes α

Figure 12 : Actions génomiques et non génomiques de T3

(adapté de Yen et al., 2006)

Dans le modèle classique (A), T3 et T4 pénètrent dans la cellule par diffusion passive ou grâce à des transporteurs membranaires. T4 est déiodée et T3 pénètre dans le noyau où elle se fixe sur les récepteurs nucléaires TR ce qui active la transcription des gènes-cibles. T3 pénètre également dans la mitochondrie où elle active la transcription des gènes-cibles mitochondriaux.

Dans un des modèles non génomiques (B), T4 et T3 se fixent sur un récepteur membranaire, l'INTEGRINE αVβ3 et active la voie des kinases MAPK. Il est possible que les sérines des TR soient phosphorylées et activent la transcription des gènes-cibles. T3 et T4 peuvent induire d'autres effets non génomiques dans le cytoplasme.

d'exemples d'actions non génomiques de l'hormone thyroïdienne, dont nous ne donnerons pas une liste exhaustive.

1. Activation de voies cytoplasmiques par T3

T3 est capable d'utiliser des signalisation membranaire telles que des voies de kinases ou la voie de la calmoduline (Davis and Davis, 1996). Dans des systèmes cellulaires variés, différents sites de liaison de T3 et T4 ont été observés : des transporteurs de la membrane plasmique, des ATPases calciques, l'adénylate cyclase, des transporteurs du glucose (Yen, 2001 ; Bassett et al., 2003), une protéine associée au réticulum endoplasmique, une propyl hydroxylase (Cheng et al., 1987) et une kinase pyruvate monomérique (Kato et al., 1989).

Récemment une nouvelle protéine de liaison a été mise en évidence. T4 et T3 stimulent l'angiogénèse dans un système de membrane chorioallantoïde de poulet, or cette action est conservée lorsque T4 est liée de façon covalente à une molécule d'agarose qui l'empêche de franchir la membrane plasmique. Comme l'INTÉGRINE $\alpha V\beta 3$ est impliqué dans l'angiogénèse, la fixation de T4 et T3 sur ce récepteur a été testée : une liaison de haute affinité a été mise en évidence. De petits ARN interférant anti-intégrine αV ou $\beta 3$ bloquent l'activation des kinases MAPK par l'hormone thyroïdienne dans les cellules CV-1. Ces données s'intègrent dans un modèle dans lequel T3 et T4 activent la cascade MAPK et stimulent l'angiogénèse par liaison à l'INTÉGRINE $\alpha V\beta 3$ (figure 12) (Bergh et al., 2005). A des concentrations physiologiques, l'hormone thyroïdienne provoque également la phosphorylation des protéines extraites des synaptosomes de cortex cérébraux de rat adultes (Sarkar et al., 2005).

Certains éléments apparaissent cependant paradoxaux. Dans un modèle de fibroblastes humains, il a été montré qu'HIF-1 α est activé par T3 (Moeller et al., 2005b). Cette activation est abolie par un inhibiteur de la voie PI3K mais pas par un inhibiteur de la voie MAPK (Moeller et al., 2005a). T3 active-t-elle réellement deux voies différentes de kinases ? Deuxièmement, dans les cellules 293T, l'activation de la voie MAPK entraîne la fixation d'une MAPK (probablement ERK2) sur TR $\beta 1$ dans le noyau et sa phosphorylation en 10 à 20 minutes, ce qui induit sa dissociation du corépresseur SMRT (Davis et al., 2000). Cette voie conduit aussi à l'acétylation de TR, favorable au recrutement des coactivateurs (Lin et al., 2005). Quant à l'activation d'HIF-1 α , elle n'est pas observée dans les fibroblastes porteur d'un

TR β muté (Moeller et al., 2005b). L'activation des kinases par T3 – T4 entraîne donc des modifications post-traductionnelles de TR qui en modifiant ses interactions avec les cofacteurs module son activité transcriptionnelle. Que T3 ou T4 active TR par une voie cytoplasmique est possible, mais il faudrait vérifier que T3 ne se fixe pas directement sur les TR dans ces systèmes. Une mutation ponctuelle de TR abolissant très spécifiquement sa liaison à T3 permettrait de répondre à cette question.

2. Activation de voies cytoplasmiques par TR / T3

Le complexe TR / T3 est également capable d'activer des voies de signalisation cytoplasmiques. Nous en donnerons deux exemples. Dans une lignée de cellules hypophysaires GH4C1, le complexe TR β / T3 active en 5 minutes la voie PI3 kinase à la membrane plasmique, en se fixant sur la sous unité régulatrice p85. Ceci stimule les canaux potassiques, plus précisément ceci ralentit la désactivation des canaux KCNH2 déjà présents à la membrane. Une mutation dans le domaine de liaison à l'ADN de TR β n'abolit pas cette action contrairement à une mutation dans le domaine de fixation de T3. Cette observation suggère que le complexe TR β / T3 ne se fixe pas sur un TRE pour réguler la transcription de gènes-cibles (Storey et al., 2006).

L'administration de T3 et T4 sur des cardiomyocytes de rats nouveaux nés en culture provoque un efflux calcique en 10 secondes (Zinman et al., 2006). Comme T3 est concentrée et métabolisée dans les fractions terminales des nerfs (Sarkar and Ray, 1994), il a été suggéré que l'hormone agisse comme un neurotransmetteur (Mason et al., 1993). Dans un modèle artificiel permettant d'étudier la signalisation calcique, Saelim et al. ont montré que la régulation du flux d'ions calcium nécessite le complexe TR / T3 (Saelim et al., 2004). Après injection d'un plasmide codant pour TR β 1, T3 augmente en 10 minutes la périodicité des vagues de Ca²⁺, médiée par la voie PI3K. Il ne s'agirait pas d'un effet transcriptionnel. D'une part, lorsqu'un plasmide rapporteur est coinjecté, son expression n'est pas activée ; d'autre part, la délétion du domaine de liaison à l'ADN de TR β 1 n'affecte pas sa capacité à réguler la voie calcique. L'effet de T3 sur la rythmicité du flux calcique pourrait résulter d'une augmentation du métabolisme mitochondrial car il est abolit par un inhibiteur de la capture des ions calcium par la mitochondrie (Saelim et al., 2004).

Les effets de T3 observés sur la transcription mitochondriale pourraient s'expliquer par la présence dans la matrice mitochondriale de p43, une des cinq isoformes codée par le gène *THRA*. P43 n'interfère pas avec les fonctions nucléaires des TR mais elle est adressée à la mitochondrie où elle régulerait l'expression de son génome (Wrutniak et al., 1995). P43 a une affinité pour T3 comparable à celles observées pour les autres TR. Elle se fixe sur quatre séquences mitochondriales analogues à des *TRE* et augmente le niveau d'ARN mitochondrial de façon T3 dépendante (Casas et al., 1999). Son action peut donc être considérée comme un effet génomique. La localisation récente des isoformes TR α 1 et TR α 2 dans la matrice mitochondriale cardiaque (Morrish et al., 2006) a cependant remis en question l'implication de p43. Récemment une lignée de souris *p43^{-/-}* a été générée, par mutation de l'ATG interne de TR α 1. Ces souris présentent un phénotype métabolique, certaines enzymes comme l'Acetyl-coenzyme A ayant une expression diminuée de façon significative (François Casas, journée Transgénèse de l'INRA 13/03/2007, Paris). Cependant certains contrôles restent à réaliser pour attribuer ce phénotype à l'absence de p43, puisque les expressions des autres isoformes de TR pourraient notamment être modifiées par la mutation.

3. Effets non génomiques indépendants de TR

Un autre mécanisme expliquant l'action de l'hormone thyroïdienne sur la mitochondrie implique la 3,5-diiodo-L-thyronine ou T2, habituellement considérée comme un produit de dégradation de T3. L'administration de T2 par injection intrapéritonéale quotidienne réduit le tissu adipeux de rats recevant une alimentation riche en graisse. En un mois, leur poids diminue de 13%, leur masse adipeuse diminue de 50% et leurs niveaux de triglycérides et de cholestérol chutent respectivement de 52% et 18%. La T2 stimule notamment l'oxydation β des acides gras et le découplage mitochondrial, principalement dans le foie (Lanni et al., 2005). T2 n'ayant qu'une faible affinité pour TR, cet effet thyromimétique impliquerait une voie non génomique (Ball et al., 1997). Cette hypothèse pourrait être confirmée par une étude sur les souris dépourvues de TR. Il serait également intéressant de tester si la T2 endogène exerce une action physiologique, en réalisant des tests fonctionnels à la concentration à laquelle T2 est détectée dans les tissus.

La 3-iodothyronamine ou T1AM, qui a aussi une faible affinité pour TR, est également un métabolite produit naturellement à partir de T3. Contrairement à T3, lorsqu'il

est injecté à la souris, le T1AM déclenche une brusque chute de la température corporelle et de la fréquence cardiaque. De plus, il réduit le volume d'éjection systolique sur un cœur isolé. Cet effet opposé à T3 suggère que la déiodation et la décarboxylation de T3 et T4 constitue une contre-régulation métabolique de la signalisation de l'hormone thyroïdienne. Une production endogène de T1AM a été notamment détectée chez la souris, le rat et l'homme. Dans des cellules EK-293, T1AM active à des concentrations nanomolaires un récepteur membranaire couplé à la protéine G, TAAR1 (Trace Amine Associated Receptor 1), dont l'activité est quantifiée par dosage de l'AMP cyclique (Scanlan et al., 2004). 5 sous types de TARR sont exprimés dans le cœur. Les actions inotrope et chronotrope négatives exercées par T1AM sur les cardiomyocytes sont augmentées en présence de génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases, tandis qu'il est atténué par la vanadate, un inhibiteur des tyrosines phosphatases. Des tyrosines phosphatases sont donc impliquées dans la transduction intracellulaire du signal. En effet, dans les ventricules, des expériences de western-blotting montrent que la phosphorylation des protéines microsomales et cytosoliques est réduite après perfusion de T1AM. Même si la signalisation moléculaire est encore mal connue, il semble donc que T1AM agisse *via* un nouveau système aminergique pour réguler la fonction cardiaque (Chiellini et al., 2007). Actuellement, en absence de méthode de dosage du T1AM endogène, il est difficile de savoir si cette molécule a réellement des actions physiologiques dans l'organisme.

Les métabolites de l'hormone thyroïdienne exercent donc des effets indépendants de la transcription, qu'on ne peut pas assimiler à des effets non génomiques de T3 puisqu'ils sont médiés par d'autres composés iodés. Dans les expériences où T3 est utilisée à 10^{-7} M, alors que sa concentration physiologique est de l'ordre de 10^{-11} M dans le sang, les effets non génomiques observés pourraient être en fait des effets de ces métabolites de T3. Il est aussi possible que, lorsqu'elle est présente en grande quantité, T3 puisse agir elle-même sur ces voies alors qu'elles sont normalement régulées par d'autres molécules iodées.

Les preuves croissantes d'actions non génomiques ont donc récemment remis en question l'importance de TR dans la signalisation de T3. Historiquement, l'identification initiale d'un récepteur nucléaire à l'hormone thyroïdienne a pu conduire à surestimer le rôle de la régulation transcriptionnelle exercé par TR dans la pathogénie de l'hypothyroïdie. La question est actuellement très controversée.

III. Intérêts et limites des modèles actuels de souris mutantes

A. Une mutation de TR n'est pas équivalente à une délétion de TR

a. Les souris dépourvues de TR n'ont pas un phénotype hypothyroïdien

1. L'aporécepteur $TR\alpha$ est responsable de la mort des souris $Pax8^{-/-}$

Bien qu'elles souffrent de nombreuses pathologies, les souris $TR\alpha^{0/0} TR\beta^{-/-}$ dépourvues de tout TR n'ont pas un phénotype caractéristique de l'hypothyroïdie (Gauthier et al., 2002). De façon surprenante, elles sont viables, tandis que les souris $Pax8^{-/-}$, dépourvues de glande thyroïde, meurent à l'âge de trois semaines (Mansouri et al., 1998). Les souris $TR\alpha^{0/0} TR\beta^{-/-}$ présentent un retard d'ossification, un retard de maturation des villosités intestinales ainsi qu'une diminution de la taille de la rate moins importante que les souris $Pax8^{-/-}$ (Flamant et al., 2002). Étant donné l'action pléiotropique de $TR\alpha$ au cours du développement, le phénotype des souris $TR\alpha^{0/0}$ est surprenant (Gauthier et al., 2001). Une autre délétion dans le locus *THRA* est responsable d'une létalité précoce, d'un important retard d'ossification et de maturation de l'intestin (Fraichard et al., 1997). Ce phénotype a été attribué à l'expression éventuellement accrue des isoformes tronquées $TR\alpha\Delta1$ et $TR\alpha\Delta2$ dans l'intestin, en absence de $TR\alpha1$ et de $TR\alpha2$ (Plateroti et al., 2001).

Pour expliquer que les souris $TR\alpha^{0/0} TR\beta^{-/-}$ ne présentent pas un phénotype hypothyroïdien, différentes hypothèses ont été émises□

1. Il pourrait exister un troisième gène codant pour un récepteur à l'hormone thyroïdienne. Cependant l'analyse du génome de la souris ne révèle aucun gène supplémentaire analogue de TR. De plus, T3 ne se fixe sur aucune protéine à haute affinité dans des extraits nucléaires de cerveau et de foie $TR\alpha1^{-/-} TR\beta^{-/-}$ (Gothe et al., 1999).

2. Une grande partie des actions de T3 sont non génomiques.

3. Ce sont les TR sous la forme aporécepteurs et non l'absence de T3 qui sont responsables du phénotype hypothyroïdien. En effet, les aporécepteurs recrutent des corépresseurs et répriment l'expression des gènes-cibles. Chez les souris dépourvues de TR, les gènes-cibles

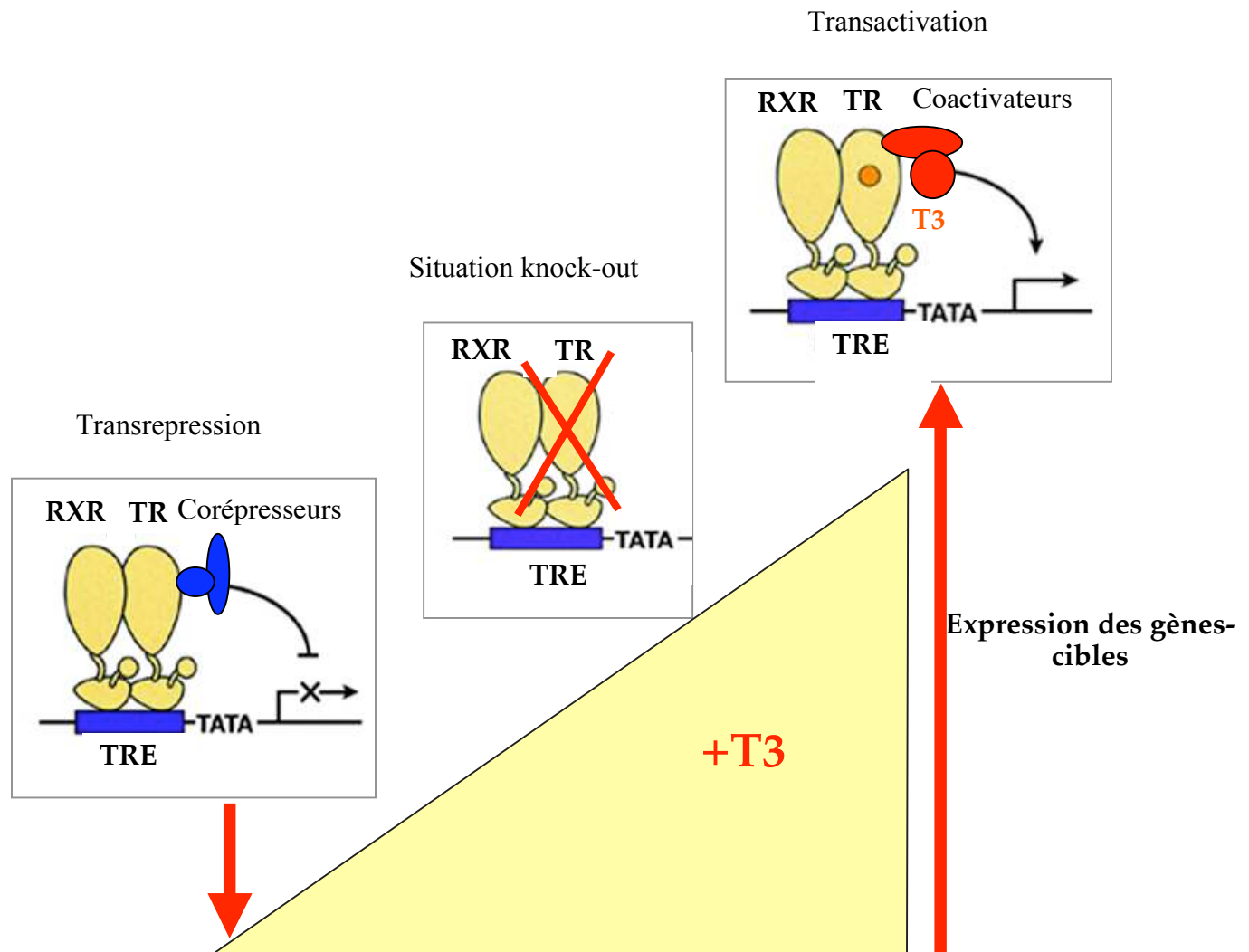


Figure 13 : L'absence de TR est moins délétère que la présence d'un aporécepteur

En présence de T3, TR active l'expression des gènes-cibles. En absence de T3, il y a une répression des gènes-cibles. La situation knock-out est intermédiaire : les gènes-cibles ne sont ni activés, ni réprimés.

ne sont ni activés, ni réprimés, la situation est intermédiaire, ce qui peut expliquer que le phénotype des souris soit moins sévère (figure 13).

Flamant et al. ont confirmé cette hypothèse en montrant que, contrairement aux souris *Pax8^{-/-}*, les souris hypothyroïdiennes et invalidées pour le récepteur TR α (*Pax8^{-/-} TR α ^{0/0}*) sont viables, les souris *Pax8^{-/-} TR β ^{-/-}* ne l'étant pas (Flamant et al., 2002). Dans un environnement physiologique dépourvue du ligand T3, les produits du gène *THRA* sont donc responsables d'anomalies létales. Plus en détail, les souris *Pax8^{-/-} TR α 1^{-/-}* ne sont pas viables, suggérant que ce n'est pas l'aporécepteur TR α 1 qui est responsable de la mort des souris (Mittag et al., 2005). Cependant les conditions d'élevage constituent un biais important dans l'observation ou non de la létalité. Des analyses phénotypiques précises sont donc requises pour comparer ces mutants, avant de conclure à une implication éventuelle de l'isoforme TR α 2 qui est surexprimée chez les souris *TR α 1^{-/-}*.

2. L'aporécepteur TR α est responsable du retard de migration des cellules granulaires externes dans le cervelet post-natal

Le phénotype développemental du cervelet nous paraît être un exemple plus ciblé et plus pertinent. Le cervelet possède une structure simple et sa maturation est tardive, essentiellement durant la période post-natale, c'est pourquoi les conséquences de l'hypothyroïdie ont été particulièrement étudiées dans cet organe (Oppenheimer and Schwartz, 1997 □ Koibuchi and Chin, 2000 □ Thompson and Potter, 2000). Le cervelet hypothyroïdien a une taille réduite à P15. Chez la souris sauvage, durant les 3 premières semaines de vie post-natale, les neurones de la couche granulaire externe (CGE) prolifèrent puis migrent à travers la couche moléculaire et la couche des cellules de Purkinje pour former et grossir la couche granulaire interne. L'hypothyroïdie congénitale induit un retard de migration des cellules granulaires externes, ce qui se traduit par une persistance anormale de la CGE à P21 alors qu'elle a normalement disparu à cet âge (Lauder, 1977). Les cellules granulaires externes sont également victimes d'un allongement de la phase proliférative et d'une augmentation de l'apoptose (Xiao and Nikodem, 1998). De plus, les cellules de Purkinje acquièrent tardivement leur forme adulte, lisse et en poire, et la résorption de leurs prolongements périsonomatiques est retardée (Legrand, 1982). Le nombre de synapses établies entre les axones des cellules granulaires et les dendrites des cellules de Purkinje est réduit (Crepel, 1975).

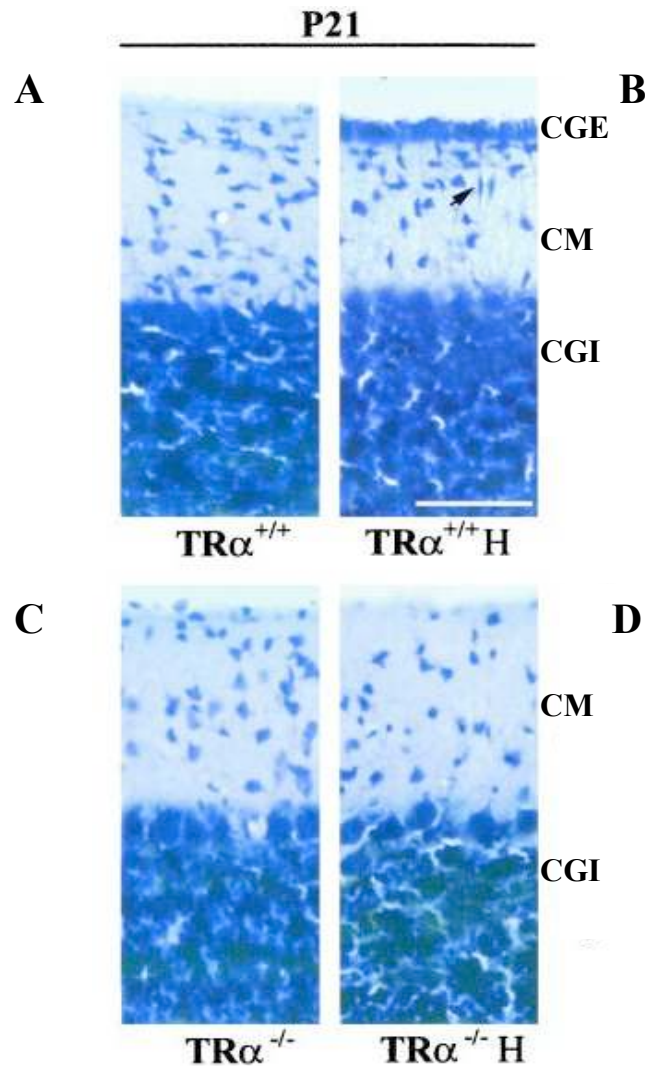


Figure 14 : L'aporrécepteur $TR\alpha$ est responsable de la persistance anormale de la couche granulaire externe à P21 lors d'hypothyroïdie
(Morte et al., 2002)

Dans le cervelet post-natal, les cellules de la couche granulaire externe (CGE) prolifèrent puis migrent à travers la couche moléculaire (CM) pour gagner la couche granulaire interne (CGI). Alors qu'à P21 la CGE a disparu chez la souris contrôle (A), l'hypothyroïdie pharmacologique (H), induite par administration de 2-mercapto-1-méthylimidazole et de perchlorate de sodium à 1%, entraîne sa persistance anormale (B). De façon surprenante, alors que $TR\alpha$ est le récepteur thyroïdien majoritairement exprimé dans le cervelet, sa délétion ($TR\alpha^{-/-}$) n'entraîne pas de persistance anormale de la CGE (C). De plus, l'hypothyroïdie pharmacologique n'induit pas non plus ce phénotype chez les souris $TR\alpha^{-/-}$ (D). La comparaison des cervelets B et D permet de conclure que la persistance de la CGE résulte de l'effet délétère exercé par le récepteur $TR\alpha$ lorsqu'il n'est pas lié à son ligand.

Dans le cerveau et le cervelet en particulier, TR α 1 est le récepteur qui est exprimé majoritairement (Bradley et al., 1994). Comme l'ensemble des souris invalidées pour une ou toutes les isoformes de TR, les souris *TR α 1*^{-/-} ne présentent pas les anomalies structurales typiques de l'hypothyroïdie dans le cervelet, c'est-à-dire la persistance de la CGE à P21 et la réduction de l'arborisation des cellules de Purkinje. Lorsqu'une hypothyroïdie expérimentale est induite chez ces souris *TR α 1*^{-/-}, elles ne présentent pas non plus ces anomalies (figure 13). Dans ce dernier cas, il est clair que l'absence de T3 n'est pas délétère car il n'y a pas de récepteur TR α . Ceci confirme que le phénotype cérébelleux des souris hypothyroïdiennes résulte de l'action délétère exercée par TR α 1 en absence d'hormone thyroïdienne (Morte et al., 2002).

b. Des mutations de *THRA* reproduisent une hypothyroïdie sévère

Certaines mutations du gène *THRA* transforment TR α 1 en aporécepteur constitutif. Afin d'étudier leurs effets sur le développement, une construction génétique par recombinaison homologue doit être réalisée dans le locus *THRA*, car les méthodes de transgénèse, dans lesquelles des promoteurs non naturels sont utilisés, conduisent à surexprimer l'aporécepteur, ou à l'exprimer de façon ectopique, entraînant un phénotype artéfactuel (Nishiyama et al., 2003).

Trois mutations différentes ont été introduites dans le locus *THRA* : la mutation PV, qui décale le cadre de lecture des 14 derniers acides aminés ce qui élimine le domaine de transactivation AF-2 et réduit l'affinité pour le ligand (Kaneshige et al., 2001b), la mutation R384C, qui réduit de dix fois l'affinité de liaison T3 / TR (Tinnikov et al., 2002) et la mutation P398H qui réduit de 50% la liaison à T3 (Liu et al., 2003). Ces mutations ont été réalisées de manière à ne pas avoir de synthèse des isoformes TR α 2 et TR $\Delta\alpha$ 2 mutées. Pour les deux premières lignées, le phénotype des souris homozygotes est, comme attendu, très proche de celui des souris hypothyroïdiennes *Pax8*^{-/-} : retard de croissance, retard d'ouverture des yeux de plusieurs jours, retard d'ossification à P15, apparition retardée des cellules B IgM positives de la rate, ralentissement de la fréquence cardiaque chez l'adulte, corrélée à un défaut de répression du gène-cible MyCH α dans le cœur à P10 et chez l'adulte. Les trois

mutations de *THRA* n'affectent que faiblement la production d'hormone thyroïdienne, régulée par TR β .

Bien qu'également létale à l'état homozygote et entraînant une bradycardie, la mutation P398H entraîne une obésité marquée à l'âge adulte, caractérisée par une adiposité viscérale et une anomalie de la stimulation de la lipolyse par les catécholamines. Malgré la mise en évidence d'une interférence plus forte de ce récepteur muté que les autres TR α 1 muté sur la signalisation de PPAR α (Liu et al., 2007) (cf. II. D. c), le phénotype métabolique particulier de ces souris reste énigmatique.

L'intérêt de la mutation R384C, qui diminue de dix fois l'affinité de liaison T3 / TR, est la possibilité d'antagoniser son effet par une forte concentration de T3. Les injections de T3 ne permettent pas de maintenir constamment un niveau d'hormone élevé dans le sang. Par contre, dans le fond génétique TR β ^{-/-}, caractérisé par un niveau de T4 dix fois supérieur à la normale, le retard de croissance est corrigé : normalisation du poids, de l'ouverture des yeux, du niveau de GH dans l'hypophyse et du niveau de MyHC β dans le coeur (Tinnikov et al., 2002). La fixation réduite de T3 sur le récepteur TR α 1R384C est donc bien responsable de ces anomalies de développement.

Ces mutants ont permis de replacer TR α 1 comme le principal médiateur de l'action de T3 au cours du développement, alors que le phénotype faible des souris knock-out avait conduit à surestimer le rôle des différentes isoformes codées par *THRA*. Notons que les récepteurs TR α 1 mutants peuvent potentiellement interférer avec l'activité de TR β dans les tissus exprimant physiologiquement les deux récepteurs comme le foie. Dans ces tissus, les souris mutantes pour TR α 1 pourraient correspondre fonctionnellement à des doubles mutants *THRA* et *THRB*.

c. Implication d'un aporécepteur TR β

Si l'action délétère de l'aporécepteur TR α 1 a été démontrée, l'implication des aporécepteurs TR β dans la pathogénie de l'hypothyroïdie est moins claire.

1. Implication dans l'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie est un symptôme de l'hypothyroïdie absent chez les souris $TR\beta^{-/-}$ (Weiss et al., 1998 □ Gullberg et al., 2000), bien que les $TR\beta$ soient les principaux récepteurs fonctionnels dans le foie (Yen et al., 2003). Pour l'expliquer, deux mécanismes pouvaient être proposés □

1. L'hypercholestérolémie est due à la perturbation d'effets non génomiques de T3, médiés par exemple par la T2.
2. L'hypercholestérolémie est due à l'action délétère exercée par les récepteurs $TR\beta$ non liés à leur ligand. Dans ce cas, ce phénotype devrait être présent chez des souris possédant une mutation dans *THRB*, qui transforme les récepteurs $TR\beta$ en aporécepteurs constitutifs. De façon surprenante, les souris exprimant le récepteur $TR\beta\Delta337T$, qui ne fixe pas T3 et induit chez l'homme un syndrome de Résistance à l'Hormone Thyroïdienne (RTH) létal à l'état homozygote (Hashimoto et al., 2001b), sont au contraire protégées de l'hypercholestérolémie induite par le régime alimentaire, suite à l'augmentation du métabolisme hépatique du cholestérol (Hashimoto et al., 2006b). Ce phénotype paradoxal s'expliquerait par la perte d'une régulation croisée entre $TR\beta$ et $LXR\alpha$ (cf. II. D. b). L'hypercholestérolémie n'est donc pas due à l'action négative exercée par des aporécepteurs $TR\beta$.

2. Implication dans le phénotype cérébral

Pour comparer les aporécepteurs $TR\alpha$ et $TR\beta$, le laboratoire de Cheng a comparé deux lignées de souris possédant la même mutation PV dans *THRA* ou *THRB*. Comme les rats hypothyroïdiens, les souris $TR\alpha^{PV/PV}$ ont une consommation cérébrale de glucose diminuée à l'âge adulte, alors qu'elle est normale chez les souris $TR\beta^{PV/PV}$ (Itoh et al., 2001). Ces souris $TR\beta^{PV/PV}$ souffrent tout de même de troubles du comportement □ hyperactivité et troubles de l'attention (Siesser et al., 2006). Elles sont sensibles aux conditions environnementales et au stress, et elles répondent de façon paradoxale au méthylphénidate, médicament utilisé pour traiter le déficit d'attention chez les enfants. Les auteurs émettent l'hypothèse que des mutations de *THRB* seraient à l'origine de certains déficits d'attention liés à l'hyperactivité, même s'il est toujours discutable d'utiliser le modèle souris pour évaluer des fonctions cognitives supérieures et des comportements complexes. La mutation $TR\beta^{\Delta337T}$, induit

également des modifications comportementales à l'âge adulte. Les souris homozygotes (viabiles) ou hétérozygotes pour cette mutation souffrent de problèmes d'apprentissage, mis en évidence par le test du labyrinthe aquatique. Un immunomarquage montre une réduction de l'expression de *BDNF* (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), un gène-cible de T3 (Neveu and Arenas, 1996), dans la région CA3 de l'hippocampe (Hashimoto et al., 2001a). Cette réduction peut expliquer le phénotype des souris, car l'inactivation de *BDNF* spécifiquement dans l'hippocampe est suffisante pour perturber la mémoire spatiale et les souvenirs aversifs (Heldt et al., 2007).

De façon surprenante, les souris $TR\beta^{A337T/+}$ ou $TR\beta^{A337T/A337T}$ adultes souffrent également de problèmes d'équilibre et de coordination, mis en évidence par les tests de la poutre, fixe ou en rotation. Leur cervelet a une taille réduite à 3,5 semaines post-natales. Or $TR\beta$ n'est exprimé que dans les cellules de Purkinje, toutes les autres cellules du cervelet exprimant $TR\alpha$ (Bradley et al., 1992). Si la couche des cellules de Purkinje a effectivement une surface réduite, la couche moléculaire est également moins développée (Hashimoto et al., 2001a), peut-être en raison d'un défaut de sécrétion de facteurs neurotrophiques par les cellules de Purkinje. A ce jour, il s'agit de la seule inactivation de $TR\beta$ responsable d'un phénotype cérébelleux. L'action de l'aporrécepteur $TR\beta$ sur le cerveau post-natal et adulte n'est donc pas claire.

3. Implication dans la tumorigénèse

A l'état homozygote, la mutation $TR\beta^{PV}$ induit des cancers spontanés de la thyroïde (carcinomes folliculaires) et de l'hypophyse (TSHomes) ainsi que des métastases (Suzuki et al., 2002; Furumoto et al., 2005). Un lien entre les deux types de tumeur n'a pas été encore été mis en évidence.

Bien que les souris $TR\beta^{-/-}$ et les souris $TR\alpha^{-/-} TR\beta^{-/-}$ présentent également des très forts niveaux de T3 – T4 – TSH, elles ne développent pas de tumeurs. L'utilisation de puces à ADN pour comparer le transcriptome hypophysaire des souris $TR\alpha^{-/-} TR\beta^{-/-}$ et $TR\beta^{PV/PV}$ a montré que l'expression de la cycline D1 est activée uniquement chez ces dernières. $TR\beta$ lié à T3 se fixe normalement sur des éléments de réponse à l'AMP cyclique dans le promoteur de la cycline D1 et réprime son expression. Cette répression est perdue seulement chez les souris $TR\beta^{PV/PV}$, sans qu'on sache pourquoi elle est conservée chez les souris $TR\alpha^{-/-} TR\beta^{-/-}$. Comme

la cycline D1 active la voie du rétinoblastome / E2F, elle serait responsable de la tumorigénèse hypophysaire (Furumoto et al., 2005). Un autre mécanisme s'ajoute □ TRβ interagit avec PTTG (Pituitary Tumor Transforming Gene) et lorsque T3 et le coactivateur SRC3 se fixent sur TRβ, l'activateur du protéasome PA28γ est recruté pour adresser le complexe au protéasome. Comme TRβPV n'est pas capable de se lier à T3, il n'induit pas la dégradation de l'oncogène PTTG par le protéasome (Furuya et al., 2007).

Dans la thyroïde et les cellules métastatiques des souris *TRβ^{PV/PV}*, la voie PI3K / AKT kinase est activée, phénomène observé dans de nombreux cancers. Le domaine de liaison du ligand de TRβPV se lie plus fortement que celui du TRβ sauvage sur la sous-unité régulatrice p85α de la PI3K, ce qui augmente son activité kinase dans le noyau et le cytoplasme (Furuya et al., 2006).

L'oncogénèse résulte donc essentiellement de la modification d'interactions directes entre TRβ et d'autres protéines, c'est-à-dire d'effets non génomiques.

La carcinogénèse de la thyroïde progresse plus vite chez les souris *TRβ^{PV/PV}* présentant une délétion concomitante de *PPARγ*, car la voie NFκB est alors activée, ce qui induit l'expression de la cycline D1 et réprime des gènes impliqués dans l'apoptose (Kato et al., 2006). La rosiglitazone, un agoniste de *PPARγ*, retarde l'apparition des carcinomes thyroïdiens chez les souris *TRβ^{PV/PV}*, en diminuant la prolifération cellulaire et en activant l'apoptose. Cependant, l'utilisation thérapeutique de la rosiglitazone chez l'homme n'est pas intéressante car des mutations de *THRB* sont rarement impliquées dans les cancers thyroïdiens (Rocha et al., 2007).

L'aporécepteur TRβ exerce donc une action carcinogène chez la souris adulte. Cependant la mutation ne semble pas avoir le même effet chez l'homme, puisque les patients souffrant de RTH ne sont pas prédisposés aux cancers.

La genèse de souris exprimant un TR muté, en particulier un TRα1 muté, a permis de comprendre que la pathogénie de l'hypothyroïdie résulte essentiellement des effets délétères exercés par les TR non liés à leur ligand. Cependant il est difficile de comprendre l'action de T3 à partir de ces mutants constitutifs.

B. Nécessité d'un nouveau modèle pour comprendre les fonctions biologiques complexes

L'hormone thyroïdienne offre une voie d'étude originale pour étudier les processus du développement et les régulations physiologiques chez l'adulte. Cependant le caractère pléiotropique de ses actions perturbe les interprétations phénotypiques, les anomalies de développement ou les dérégulations des grandes voies métaboliques empêchant toute analyse fonctionnelle détaillée.

a. Actions directes et indirectes de T3

1. Actions directes et indirectes de T3 sur les progéniteurs cellulaires

Bien qu'une action directe de T3 ait été mise en évidence *in vitro* sur de nombreux types de progéniteurs cellulaires (cf. tableau 1), il est extrêmement difficile de comprendre ses effets directs et indirects *in vivo*. Alors que le mécanisme d'action de T3 sur l'os a pu être partiellement élucidé, son action sur le cervelet demeure incomprise.

1.1. L'os

Le mécanisme d'action de l'hormone thyroïdienne sur l'os a été l'objet de nombreuses controverses. Il a notamment été proposé que ce soit la TSH et non la T3 qui soit impliquée. En effet, les souris *TSHR*^{+/-}, qui ont un niveau d'expression du récepteur de la TSH réduit de 50%, souffrent d'une ostéoporose sévère. Ce phénotype est encore plus sévère chez les souris *TSHR*^{-/-}. L'administration ponctuelle d'extraits thyroïdiens à la naissance ne corrige pas leur phénotype, bien qu'il normalise leur poids. Comme des récepteurs à la TSH ont été identifiés sur les ostéoblastes (cellules qui synthétisent la matrice osseuse) et les précurseurs des ostéoclastes (cellules qui dégradent la matrice osseuse), il a été supposé que TSH contrôle directement le remodelage osseux. *In vitro* des cellules souches hématopoïétiques cultivées en présence de cytokines et du ligand de RANK forment des ostéoclastes en 6 jours. TSH inhibe leur formation et leur survie par atténuation des signalisations JNK / C-JUN et NFκB en réponse au ligand de RANK et au TNFα (Abe et al., 2003). *In vivo*, TNFα a un niveau

d'expression augmenté chez les souris *TSHR*^{+/-} ou *TSHR*^{-/-} et son inactivation supprime leur phénotype osseux, il est donc impliqué dans la pathogénie de l'ostéoporose (Hase et al., 2006).

Cependant, ces expériences ne prouvent pas que la TSH agisse directement sur les ostéoclastes *in vivo*. En effet, le phénotype des souris *TSHR*^{+/-} ou *TSHR*^{-/-} peut simplement résulter de l'hypothyroïdie induite par l'absence des récepteurs de la TSH (Stein et al., 1994). L'implication de T3 a été testée par l'administration d'extraits thyroïdiens à la naissance, cependant ce protocole ne permet pas de restaurer un niveau normal de T3 et T4 circulantes durant toute la période post-natale et adulte. De plus, ces extraits sont sûrement contaminés par de la calcitonine, hormone hypocalcémiante, et de la parathormone, hormone hypercalcémiante et hypophosphatémiante. Or les souris *TRα*^{0/0} souffrent d'un retard d'ossification endochondrale durant la période post-natale et d'ostéosclérose à l'âge adulte, bien qu'elles aient un niveau normal de TSH (Bassett et al., 2007). L'action de T3 sur l'os semble donc principalement médiée principalement par TRα, qui s'avère ainsi une cible thérapeutique potentielle.

Le retard de croissance dont souffrent les souris *TRα*^{0/0} résulte d'un retard de formation de l'os endochondral. La progression de la différenciation des chondrocytes hypertrophiques est affectée dans la plaque de croissance, désorganisée et immature (Fraichard et al., 1997; Dhanraj et al., 1999). Cultivés en présence de T3, les chondrocytes, issus de la plaque de croissance de l'épiphyse du tibia ont une activité phosphatase alcaline (marqueur terminal de différenciation) qui augmente de 7 fois et une incorporation de thymidine tritiée qui diminue de 50%. T3 est donc indispensable à la différenciation terminale des chondrocytes (Ohlsson et al., 1992). Cependant, l'administration d'hormone de croissance GH de P18 à l'âge de 10 semaine rétablit la croissance des souris *TRα*^{-/-} *TRβ*^{-/-}, bien que le défaut d'ossification persiste (Kindblom et al., 2001). Ceci suggère qu'il existe un effet direct et un effet indirect de TR sur le cartilage.

La comparaison du phénotype osseux des souris possédant la même mutation PV soit dans le locus *THRA* soit dans le locus *THRB*, a permis de mieux comprendre ces deux mécanismes (O'Shea et al., 2005). Les souris *TRα*^{PV/+} ont une production hypophysaire de GH normale (Kaneshige et al., 2001b), alors qu'elle est réduite de 80% chez les souris

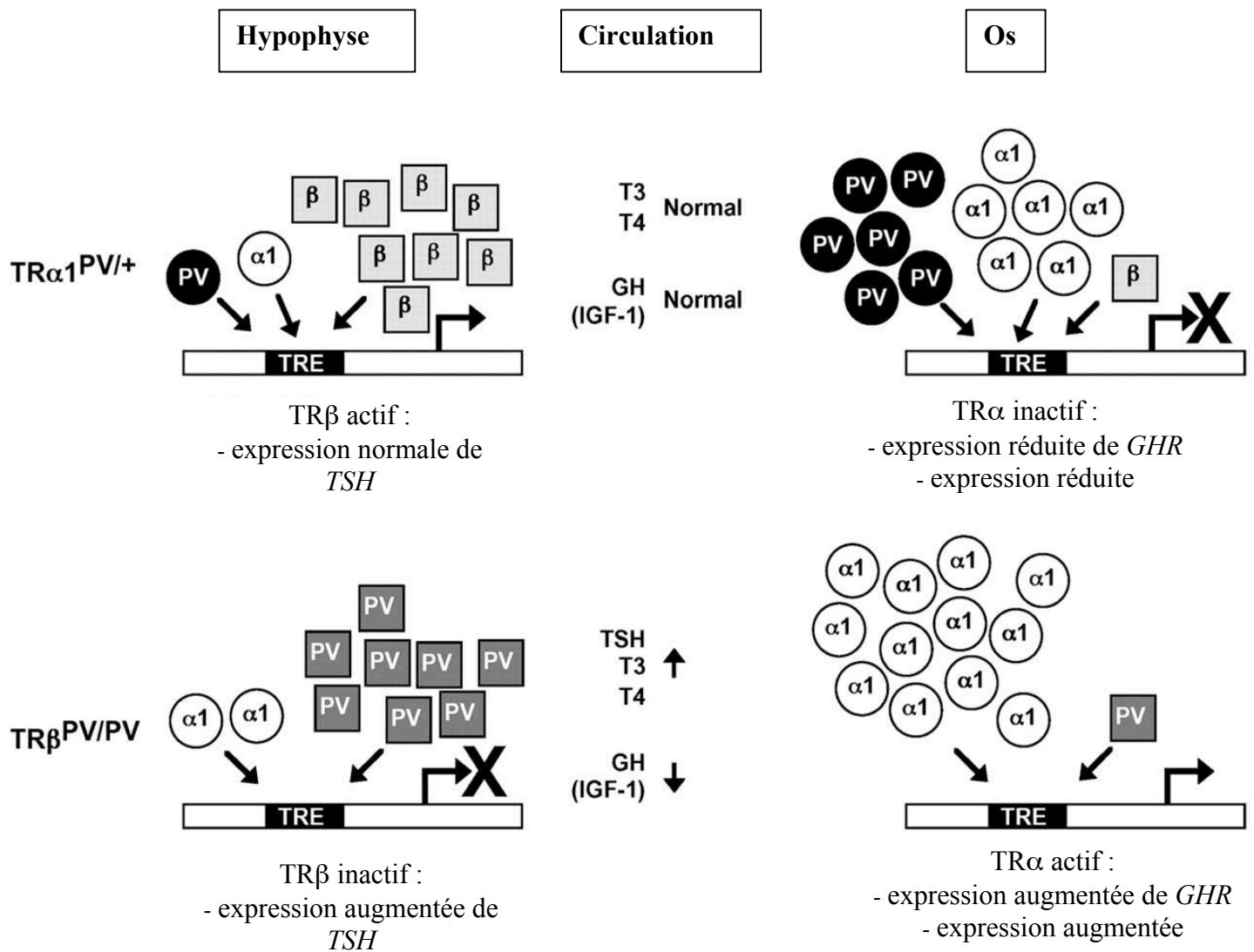


Figure 15 : Actions directes et indirectes de T3 sur le développement de l'os
(O'Shea et al., 2005)

La comparaison du phénotype osseux entre deux lignées possédant la même mutation PV, soit dans le locus *THRA* soit dans le locus *THRB*, a permis d'identifier deux mécanismes d'action de l'hormone thyroïdienne sur le développement de l'os : TR α active l'expression des récepteurs à GH et à IGF1 directement dans l'os, tandis que TR β agit de façon indirecte en activant la production de GH dans l'hypophyse.

$TR\beta^{PV/PV}$, ce qui s'accompagne d'une réduction de 40% du niveau d'IGF1 circulant (Kaneshige et al., 2000; Suzuki and Cheng, 2003). $TR\beta$ est donc l'isoforme qui régule la production hypophysaire de GH.

Malgré cette diminution de GH, les souris $TR\beta^{PV/PV}$ présentent une ossification endochondrale et intramembranaire avancée et une élévation de l'expression de $IGF1$, un gène-cible de T3 (Stevens et al., 2003a), caractéristiques d'une thyrotoxicose squelettique. Ce phénotype peut s'expliquer par la dérégulation de l'axe thyroïdien. En effet, les souris $TR\beta^{PV/PV}$ ont des niveaux de T3, T4 et TSH respectivement augmentés de 9, 15 et 412 fois (Kaneshige et al., 2000). La grande quantité de T3 circulante peut activer le récepteur $TR\alpha1$, qui est intact chez ces souris. Ceci suggère que $TR\alpha1$ est la principale isoforme active dans la plaque de croissance (O'Shea et al., 2003). Cette hypothèse a été confirmée par le phénotype des souris $TR\alpha1^{PV/+}$ qui présentent un retard l'ossification endochondrale et intramembranaire, une réduction de l'expression de GHR et d' $IGF1R$ ainsi qu'une croissance post-natale retardée, en absence de perturbation des niveaux de T3, T4 et de GH (Kaneshige et al., 2001b).

Similairement, les souris $TR\alpha^{0/0}$ adultes souffrent d'ostéosclérose due à une hypothyroïdie squelettique, tandis que les souris $TR\beta^{-/-}$ adultes souffrent d'ostéoporose due à une hyperthyroïdie squelettique (Bassett et al., 2007).

Ainsi une action directe et une action indirecte de l'hormone thyroïdienne ont pu être identifiées à partir de mutants constitutifs, parce que chacune implique une isoforme de TR différente : $TR\alpha$ active l'expression des récepteurs à GH et à IGF1 directement dans l'os, tandis que $TR\beta$ agit de façon indirecte en activant la production de GH dans l'hypophyse (figure 15).

1.2. Le cervelet

Au contraire, dans le cervelet post-natal, le mécanisme par lequel T3 favorise la migration des cellules granulaires externes est encore inconnu.

Différents modèles ont permis d'étudier l'action de l'hormone thyroïdienne sur les neuroblastes : culture de tissu entier (Romijn et al., 1981), cultures d'agrégats de cellules cérébrales (Honegger and Lenoir, 1980), culture enrichies en neurones sensitifs primaires de

rats (Walter, 1996), cultures primaires de neurones issus de cerveaux embryonnaires de rats (Filipcik et al., 1994), culture de cellules granulaires dissociées de cervelet (Heisenberg et al., 1992). Les cellules granulaires externes de rat hypothyroïdiens cultivées *in vitro* présentent une augmentation du temps de doublement et une diminution du pourcentage de cellules en phase S (Muller et al., 1995). De plus T3 inhibe leur apoptose, ce qui suggère une action autonome sur ces neurones. T3 accélère également la croissance des neurites, ainsi que la maturation fonctionnelle des synapses.

Cependant, le retard de migration des cellules granulaires n'est pas forcément un effet direct de T3 sur ces neuroblastes. Dans le cervelet post-natal, T3 peut agir uniquement sur les cellules de Purkinje et perturber secondairement la migration des cellules granulaires externes, suite à la réduction des contacts synaptiques entre les deux types de neurones (Nicholson and Altman, 1972 □ Vincent et al., 1982) ou à un défaut de sécrétion de facteurs neurotrophiques comme IGF1 (Elder et al., 2000) et BDNF (Neveu and Arenas, 1996). L'arborisation dendritique des cellules de Purkinje cultivées *in vitro* augmente fortement en présence de T3 (Heuer and Mason, 2003). TR est impliqué dans la différenciation précoce des cellules de Purkinje (F. Boukhtouche et al., données non publiées), cependant l'isoforme de TR impliquée est controversée. Les cellules de Purkinje expriment TR β (Strait et al., 1991), une mutation de *THRB* réduit leur nombre et leur arborisation (Hashimoto et al., 2001a), tandis que l'administration à des souris hypothyroïdiennes de GC-1, agoniste spécifique de TR β , rétablit partiellement ce phénotype (Morte et al., 2002). Cependant, T3 ne stimule pas la croissance dendritique de cellules de Purkinje *TR α 1^{-/-}* cultivées *in vitro* (Heuer and Mason, 2003). Les deux récepteurs pourraient avoir une action séquentielle, l'action première de TR α serait relayée ensuite par TR β , ce qui expliquerait que les souris exprimant un récepteur muté TR α 1R384C n'aient qu'un défaut transitoire de l'arborisation des cellules de Purkinje à P15 (Venero et al., 2005).

T3 peut également agir indirectement sur les cellules granulaires *via* d'autres types cellulaires, notamment la glie radiaire. Les prolongements de Bergmann, des astrocytes qui guident la migration des cellules granulaires externes, sont plus nombreuses lors d'hypothyroïdie (Clos and Legrand, 1973), en raison d'un allongement de la période de prolifération des astroblastes (Clos et al., 1982). Des cellules granulaires externes cultivées non pas sur des cellules de Bergmann mais de simples astrocytes ont des neurites allongées de

60% (Martinez and Gomes, 2002) et une prolifération 2,5 fois plus élevée lorsque les astrocytes ont été préalablement exposés à T3 (5×10^{-8} M) pendant 3 jours (Gomes et al., 1999). L'exposition à T3 entraîne deux types de modification chez les astrocytes (Martinez and Gomes, 2002 □ Martinez and Gomes, 2005) :

1. Augmentation des composants de la matrice extra-cellulaire comme la fibronectine et la laminine, ce qui modifie leurs contacts cellulaires.
2. Activation de la sécrétion du facteur de croissance épidermique EGF, dont les effets sont médiés par une voie protéine kinase.

Le phénotype des cellules granulaires externes dans les cervelets hypothyroïdien peut donc résulter d'une anomalie des cellules de Bergmann qui guident leur migration.

Enfin la myélinisation est retardée par l'hypothyroïdie néonatale, en raison d'une diminution du nombre d'oligodendrocytes différenciés (Ibarrola et al., 1996). *In vitro*, T3 arrête la prolifération des précurseurs des oligodendrocytes et induit leur différenciation (Ahlgren et al., 1997) suite à l'activation des inhibiteurs de cycline p18, p21 et p27 (Durand and Raff, 2000), sans qu'il ait été prouvé que ces gènes soient directement régulés par TR / T3. Cette action est médiée par le récepteur TR α 1 (Billon et al., 2002). Cette propriété a été récemment utilisée pour induire la différenciation de cellules embryonnaires souches humaines en oligodendrocytes, dans l'espoir de traiter les pathologies de démyélinisation (Kang et al., 2007). T3 favorise aussi la maturation des oligodendrocytes, notamment l'allongement de leurs prolongements cellulaires (Baas et al., 1997). Or l'ablation génétique des oligodendrocytes induit une désorganisation des couches corticales, une foliation anormale, une altération de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje, une réduction du nombre des cellules granulaires et une désorganisation de la glie de Bergmann (Mathis et al., 2003). Notons que ce phénotype peut résulter d'effets toxiques, puisqu'un grand nombre de cellules meurt simultanément. Les oligodendrocytes peuvent donc également être suspectés de médier les actions cérébelleuses de T3.

Etant donné que tous les types de cellules neurales sont sensibles à T3 *in vitro* et que les interactions cellulaires sont complexes pendant le développement du cerveau (figure 16) (Zimmermann, 2006), le mécanisme d'action de T3 sur le cervelet post-natal demeure incompris.

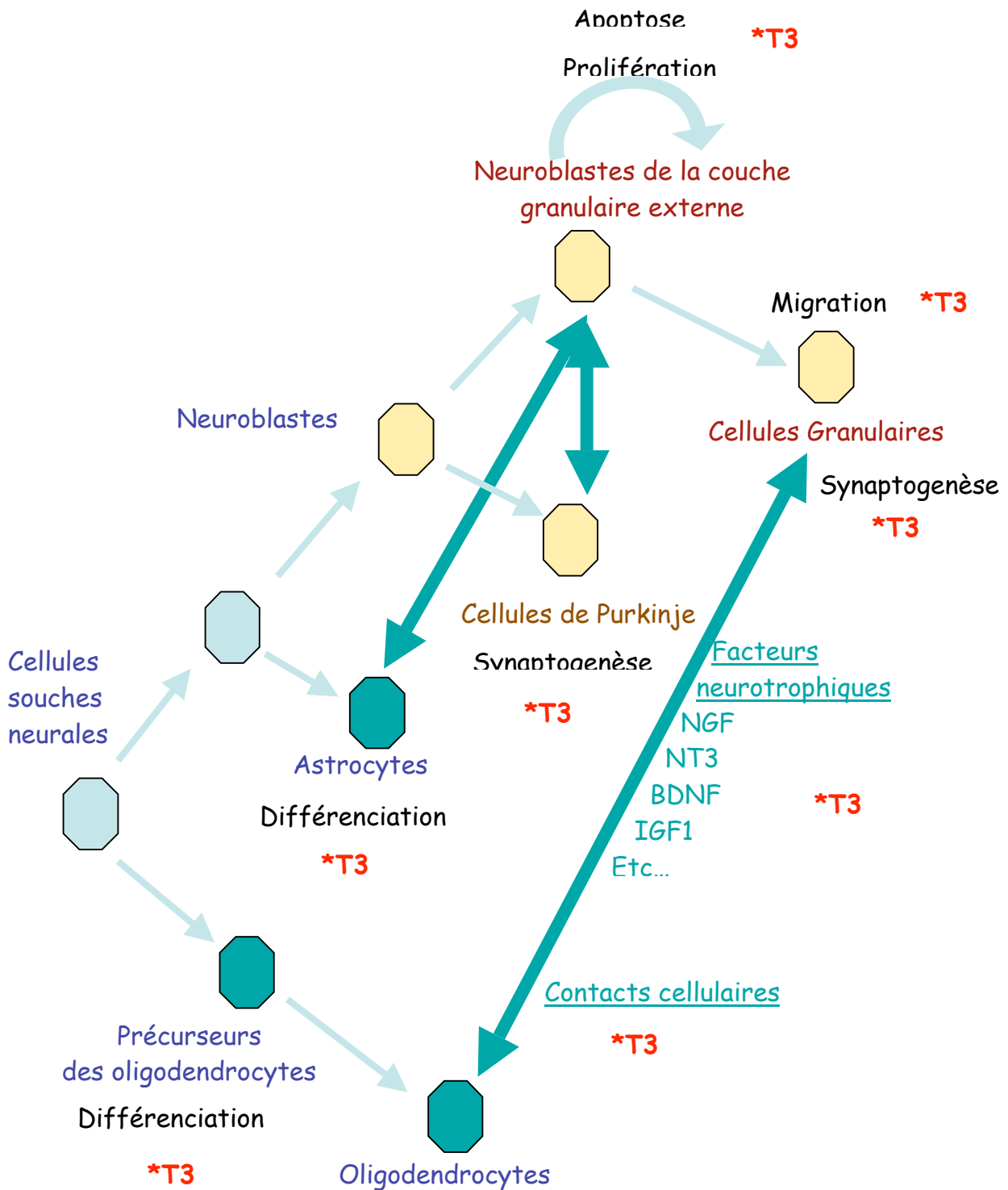


Figure 16 : Action de l'hormone thyroïdienne au cours de la différenciation des cellules neurales du cervelet

Tous les types cellulaires produits au cours de la différenciation neurale sont sensibles à l'hormone thyroïdienne (*T3). Les effets de T3 sont directs (en noir) ou indirects (en vert).

2. Difficulté de séparer les actions développementales des actions physiologiques

Il est difficile de comprendre les actions de T3 dans l'espace (sur un type cellulaire) mais également dans le temps. Il est notamment délicat de distinguer les effets développementaux de T3 de ses effets à l'âge adulte à partir de mutants constitutifs. L'action de T3 sur le cerveau adulte servira d'exemple.

Les tests de comportement (champ ouvert, nage forcée) des souris dépourvues de récepteurs TR α (Wilcoxon et al., 2007), TR α 1 (Guadano-Ferraz et al., 2003) ou exprimant TR α 1R384C (Venero et al., 2005), montrent une hypoactivité, un problème d'apprentissage spatial et de mémorisation ainsi qu'une forte anxiété. Cependant les tests de comportement réalisés sur des souris souffrant de problèmes de développement et de pathologies systémiques sont difficilement interprétables. Les auteurs de la première étude (Wilcoxon et al., 2007) soulignent que les mères TR $\alpha^{0/0}$ ont un niveau de T4 diminuée (Gauthier et al., 2001), or l'hypothyroïdisme maternel modérée peut entraîner des anomalies de développement cortical chez la progéniture (Lavado-Autric et al., 2003). Les anomalies comportementales des souris peuvent donc avoir une origine très indirecte.

L'objectif a donc été de séparer les effets développementaux des effets de T3 sur le cerveau adulte. Comme l'activité du récepteur mutant TR α 1R384C est restaurée par une forte concentration de T3, les souris TR α 1^{R384C/+} ont reçu des injections quotidiennes d'hormone thyroïdienne de P10 à P35, afin de prévenir les anomalies de développement post-natal. L'anxiété des souris persiste, mais les problèmes locomoteurs des souris disparaissent, ils sont donc vraisemblablement liés au développement post-natal anormal du cervelet. Au contraire, l'administration orale de T3 à l'âge adulte, de façon continue depuis le 12^{ème} jour précédant les tests comportementaux, corrige l'anxiété des souris. Il s'agirait donc d'une pathologie adulte et non développementale (Venero et al., 2005). Cependant, le système utilisé pour restaurer la fonction de TR α 1 est très artificiel car il entraîne des effets secondaires, comme l'activation périphérique et centrale des récepteurs TR β 1 et TR β 2, en réponse à la forte concentration de T3 dans le sang.

Le comportement significativement différent des souris mutantes pour TR α dans les tests d'exploration de l'environnement et les tests de conditionnement au stress met en évidence un dysfonctionnement de l'hippocampe, une structure impliquée de façon cruciale dans l'apprentissage et la mémorisation. L'hypothyroïdie pré- et post-natale induite par le PTU empêche la transmission et la plasticité synaptique dans l'hippocampe de rat : la transmission synaptique excitatrice est augmentée, la potentialisation à long terme de l'excitation post-synaptique, qui est le support de la mémorisation à court terme, est réduite (Sui and Gilbert, 2003). Dans l'hippocampe des souris *TR α ^{-/-}*, le nombre de terminaison des interneurons GABAergiques sur les neurones pyramidaux est diminué (Guadano-Ferraz et al., 2003). L'origine pourrait être une différenciation anormale des interneurons au cours du développement post-natal. Comme chez le rat (Berbel et al., 1996), l'administration de PTU de E6,5 à P21 entraîne chez la souris une réduction de l'immunoréactivité à la parvalbumine, un marqueur des interneurons GABAergiques, dans le néocortex et plus encore dans l'hippocampe (50 à 75%) à P21. Si les animaux ne reçoivent pas de T4 pendant cette période, cet effet persiste à l'âge adulte, malgré le retour à un statut thyroïdien normal à partir de P21. Il entraîne alors une diminution de l'inhibition GABAergique dans le cerveau adulte (Gilbert et al., 2007).

Cependant, les souris *TR α ^{R384C/+}* qui ont reçu de la T3 à l'âge adulte ne souffrent plus d'anxiété ni de problèmes de mémorisation, ce qui suggère que l'hippocampe a retrouvé une fonction normale (Venero et al., 2005). T3 a donc une action directe sur l'hippocampe adulte. Un mécanisme particulièrement intéressant a été mis en évidence : l'hormone thyroïdienne régule localement la neurogenèse. Dans l'hippocampe de rat rendu hypothyroïdien à l'âge adulte par administration de PTU ou de MMI, le nombre de cellules en division, marquées par incorporation de BrdU, est réduit (Desouza et al., 2005). Les neurones granulaires produits dans le gyrus dentelé expriment de façon prolongée TUC4, un marqueur de neuroblaste, et présentent une morphologie immature (Ambrogini et al., 2005). *In vitro*, les progéniteurs des neurones de l'hippocampe ont une prolifération, une survie et une différenciation gliale améliorée par T3 (Desouza et al., 2005). Montero-Pedrazuela et al. ont observé une réduction de 30% de la prolifération dans la zone subgranulaire du gyrus dentelé lors d'hypothyroïdie transitoire (Montero-Pedrazuela et al., 2006). Or le syndrome dépressif est lié au nombre de nouveaux neurones générés dans le gyrus dentelé. Les rats hypothyroïdiens obtiennent les mêmes performances que les rats contrôles dans un test de reconnaissance des objets, mais

leur performance est réduite dans le test de nage forcée, signe d'un syndrome dépressif. L'injection d'hormone thyroïdienne restaure la neurogenèse et le comportement de ces animaux (Montero-Pedrazuela et al., 2006). Des études supplémentaires sont cependant requises pour déterminer si T3 est impliquée dans le syndrome dépressif.

Afin de tester si T3 a une action génomique dans les cellules souches neurales, ces cellules ont reçu un transgène rapporteur *Luciférase*, dont l'expression est contrôlée par le promoteur de *c-Myc*. L'activité de ce promoteur est régulée négativement par T3 dans des neuroblastomes (Perez-Juste et al., 2000). L'expression du gène rapporteur *Luciférase* double chez les souris hypothyroïdiennes, tandis qu'elle est réduite par l'administration de T3 pendant 2 semaines ou 3 jours. Une mutation de l'élément de réponse *TRE* présent dans le promoteur de *c-Myc* abolit cet effet. T3 pourrait donc agir *via* TR pour réguler directement la transcription de gènes-cibles dans les cellules souches neurales (Lemkine et al., 2005).

Afin d'identifier des gènes dérégulés dans l'hippocampe des souris $TR\alpha^{0/0}$ adultes, Wilcoxon et al. se sont intéressés aux gènes impliqués dans l'apprentissage et la mémorisation. Ils ont notamment observé une diminution de l'expression du récepteur des glucocorticoïdes GR dans l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'amygdale. Ce phénotype est aggravé par l'hypothyroïdie expérimentale, ce qui suggère que le récepteur $TR\beta$ ou des effets non génomiques pourraient être impliqués (Wilcoxon et al., 2007). L'injection directe d'hormone thyroïdienne dans l'hippocampe dorsal de rat améliore la mémorisation à long terme et retarde le conditionnement de peur (Sui et al., 2006). L'injection de T3 dix minutes avant le premier entraînement ou juste après le début de l'entraînement a un effet immédiat qui disparaît en 24h. Cette réponse rapide suggère qu'il s'agit d'un effet non génomique. On peut cependant s'interroger sur la pertinence des tests de comportement après une expérience aussi invasive.

Différents mécanismes moléculaires sont donc proposés pour expliquer l'action de l'hormone thyroïdienne sur le comportement : un développement embryonnaire et / ou post-natal anormal des interneurons de l'hippocampe, une réduction de la neurogenèse à l'âge adulte, des effets transcriptionnels à court terme médiés par $TR\alpha$ et des effets non génomiques rapides. Cependant il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles vraiment appropriés à ces études pour déterminer le mécanisme prépondérant. L'hypothyroïdie induit donc un phénotype cérébral difficile à comprendre, en particulier chez l'adulte, étant donné

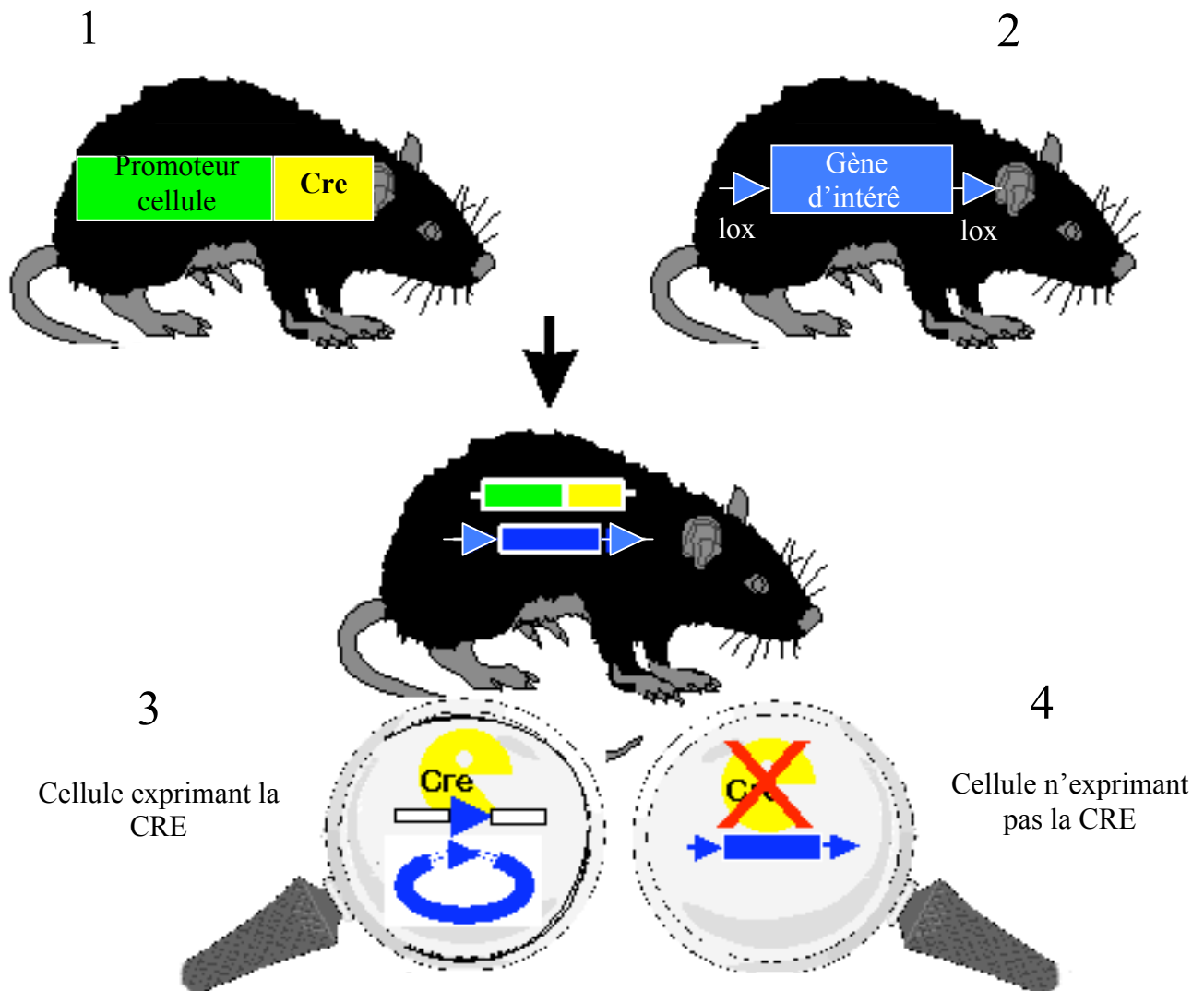


Figure 17 : Le système de recombinaison CRE/loxP

Le système CRE/loxP permet de générer des mutations restreintes à un type cellulaire. Des souris transgéniques exprimant la recombinaise CRE dans un type cellulaire particulier grâce à l'emploi d'un promoteur approprié (1) sont croisées avec des souris porteuses d'un allèle floxé, c'est-à dire présentant deux séquences *loxP* encadrant une partie essentielle du gène d'intérêt sans pour autant perturber son fonctionnement (2). Dans les cellules où elle est exprimée, la recombinaise CRE excise la portion d'ADN située entre les séquences *loxP* et induit une mutation nulle (3) (Metzger et al., 1999). Dans les autres cellules, la mutation est silencieuse (4).

que des interactions cellulaires complexes se superposent à des problèmes développementaux. Pour comprendre les actions directes et indirectes de T3, des mutants conditionnels sont requis.

b. Le système de recombinaison CRE/*loxP*

Les systèmes de recombinaison sont aujourd'hui largement utilisés pour générer des invalidations conditionnelles. Concernant le système CRE/*loxP*, il faut dans un premier temps créer des souris porteuses d'un allèle dans lequel deux séquences *loxP* encadrent une partie essentielle du gène d'intérêt sans pour autant perturber son fonctionnement, en les plaçant par exemple dans les introns. L'allèle est dit « floxé ». Ces souris sont alors croisées avec une souris transgénique exprimant la recombinaise CRE dans un type cellulaire particulier grâce à l'emploi d'un promoteur approprié. La recombinaise entraîne l'excision des séquences situées entre les sites *loxP* et induit une mutation nulle dans le type cellulaire dans lequel le transgène s'exprime (figure 16) (Metzger and Feil, 1999). Cette stratégie est d'une très grande puissance, car elle permet de contourner les problèmes de létalité embryonnaire et d'examiner l'effet de la mutation dans n'importe quel tissu, à condition de disposer d'une lignée de souris transgéniques exprimant la protéine CRE dans ce tissu. Notons que le système CRE/*loxP* permet également de générer des mutants conditionnels par construction d'un allèle floxé adéquat, par exemple en plaçant une cassette floxée bloquant temporairement l'expression de la mutation.

Une version inductible de la CRE a été générée en fusionnant sa séquence avec le domaine de fixation du ligand (LBD) du récepteur des oestrogènes, muté pour qu'il ne fixe non plus l'oestradiol mais un analogue synthétique, le tamoxifène. Cette protéine fusion CREERT ne possède pas d'activité CRE, mais la fixation du tamoxifène induit un changement de conformation qui restaure son activité. L'administration de tamoxifène à des souris transgéniques exprimant la CREERT induit la délétion d'un locus floxé (Feil et al., 1996). Des versions optimisées de cette CREERT ont ensuite été générées, la CREERT2 étant la plus efficace (Indra et al., 1999).

La création récente de souris possédant un *THRA* ou *THRB* floxé permet de commencer à disséquer l'action de l'hormone thyroïdienne *in vivo*. Cependant la délétion des TR ne reproduisant pas le phénotype hypothyroïdien, il était nécessaire de générer une nouvelle lignée de souris exprimant de façon conditionnelle un récepteur TR muté.

C. Conclusion et objectifs de la thèse

L'hormone thyroïdienne est connue depuis plus d'un siècle pour induire la métamorphose du Xénope. Des préchordés aux mammifères, en passant par les poissons et les amphibiens, T3 induit des modifications drastiques de la morphologie et de la physiologie, permettant fréquemment d'adapter l'organisme à un changement de biotope. L'identification de récepteurs nucléaires à l'hormone thyroïdienne a permis de comprendre son mécanisme d'action moléculaire. Les TR sont des facteurs de transcription pour lesquels le simple ajout du ligand, la T3, permet de basculer de la transrépression à la transactivation des gènes-cibles. Il est alors possible d'accéder directement aux programmes génétiques impliqués dans ces «métamorphoses».

La génétique de la souris a récemment permis de revisiter l'hypothyroïdie, grâce à la genèse de modèles invalidés pour une ou plusieurs isoformes de TR. L'analyse phénotypique de ces modèles a mis en évidence une action spécifique de ces récepteurs dans un tissu donné à un moment donné. Le répertoire des gènes-cibles varie selon l'organe et la période de développement (cf. tableau 1). Les études moléculaires ont montré que l'action de T3 est modulée par des interactions spécifiques et dynamiques entre un élément de réponse *TRE*, une isoforme de TR et un grand nombre de cofacteurs. L'activité des TR n'est donc pas uniquement contrôlée par la liaison du ligand. De plus, les TR sont impliqués dans de nombreuses régulations croisées avec d'autres récepteurs nucléaires, qui, à l'échelle collective, tissent un véritable réseau transcriptionnel. Ces états de fait compliquent l'identification des gènes-cibles, qui nécessitent donc des modèles respectant au mieux les conditions physiologiques. L'un des objectifs de cette thèse a été d'identifier ces gènes-cibles dans le cervelet au cours du développement post-natal.

L'utilisation des souris knock-out a cependant posé un problème immédiat : leur phénotype est moins sévère qu'attendu, même pour les souris *TR α ^{0/0} TR β ^{-/-}* complètement

dépourvues de TR. L'importance des TR dans la signalisation de T3 a donc été remise en question. Or une mutation de *THRA* reproduit en grande partie l'hypothyroïdie congénitale, ce qui a permis de comprendre que cette pathologie résulte essentiellement de la présence de TR α non lié à son ligand.

Cependant, ces mutants constitutifs ne permettent pas de disséquer l'action de T3 *in vivo*, du fait des actions pléiotropiques de l'hormone. En effet, ces mutants présentent de nombreuses anomalies de développement, qui empêchent toute analyse phénotypique fine chez l'adulte. De plus, comme un grand nombre de tissus ont un fonctionnement perturbé, il est extrêmement difficile de distinguer les actions directes et indirectes de T3 sur un type cellulaire donné. L'essentiel de notre travail de thèse a donc consisté à créer un nouveau modèle de souris mutantes qui permet d'exprimer de façon conditionnelle un récepteur TR α 1 muté, afin de supprimer la réponse à T3 à un moment donné dans un tissu donné.

Nos travaux ont également montré que les aporécepteurs TR exercent des actions physiologiques au cours du développement□d'une part leur présence a été détectée dans le cerveau en développement, grâce à un système rapporteur pour l'activité de T3. D'autre part nous avons participé à une étude qui a montré que TR α exerce une répression physiologique des gènes-cibles de T3 au cours du développement embryonnaire du cœur.

RESULTATS

I. La signalisation de T3 dans le cerveau en développement est hétérogène

A. Démarche scientifique

Pour définir précisément dans quelles structures cérébrales et à quel stade du développement agit T3, un modèle rapporteur a été utilisé : les souris transgéniques *FindT3*.

Le système *Find* a été mis au point pour déterminer le patron d'activité de l'acide rétinoïque, qui agit *via* des récepteurs nucléaires RAR, très proche des TR. Dans les années 1990, différentes équipes ont utilisé des systèmes rapporteurs pour l'activité des rétinoïdes, basés sur des éléments de réponse à RAR (*RARE*) placés devant le gène rapporteur *LacZ* (Balkan et al., 1992 □ Colbert et al., 1993 □ Niederreither et al., 2002). Mais ces systèmes entraînaient des doutes persistants sur la spécificité d'expression du gène *LacZ*. En effet, les *RARE* sont aussi des éléments de réponse à d'autres récepteurs nucléaires, notamment CAR, TR2, NGFI-B et COUP-TF (Aranda and Pascual, 2001).

Pour contourner ce problème, Solomin et al. (Solomin et al., 1998) ont construit des souris possédant un transgène effecteur, qui code pour un récepteur hybride GAL4-RAR, et un transgène rapporteur, qui possède des éléments de réponse à GAL4 (*GAL4-RE*) suivis du gène *LacZ*. Le récepteur GAL4-RAR possède le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 de la levure et le domaine de liaison du ligand de RAR. Il se fixe sur les *GAL4-RE* et en présence d'acide rétinoïque et de coactivateurs il transactive l'expression du gène *LacZ*. L'élément de réponse *GAL4-RE* n'est pas activé par les facteurs de transcription des mammifères. Pour augmenter la sensibilité de détection, le système *Find* a été mis au point. *pFindRAR* (Mata De Urquiza et al., 1999) possède des éléments de réponse *GAL4-RE* en amont de la séquence *GAL4-RAR*. Ainsi, en présence d'acide rétinoïque et de coactivateurs, le récepteur hybride transactive sa propre expression □ le système est donc auto-inductible (*Find = Feedback Inducible Nuclear receptor Driven*).

Différents promoteurs ont été testés pour *GAL4-RAR* et *GAL4-RE LacZ*, *in vitro* et *in vivo* (Mata De Urquiza et al., 1999). Le promoteur minimal *hsp68* donne un patron d'expression de *LacZ* identique pour 70 à 90% des embryons. Le plasmide *pFind*, contenant seulement le DBD de *GAL4* non fusionné au LBD d'un récepteur nucléaire, est exprimé dans 1 embryon sur 4, selon un patron totalement aléatoire. L'expression de *LacZ* est donc bien gouvernée par le récepteur *GAL4-RAR* activé.

Les éléments de réponse à T3 les plus étudiés sont des *DR4*. Comme ce sont aussi des éléments de réponse pour les récepteurs nucléaires LXR et FXR (Aranda and Pascual, 2001), la même stratégie que Solomin et al. a été utilisée pour déterminer spécifiquement le patron d'activité de T3 dans le cerveau.

B. Résumé de l'article 1

Des souris transgéniques ont été générées afin de déterminer le patron d'activité de T3. Le plasmide *pFindT3* a été construit par Frédéric Flamant à partir du plasmide *pFindRAR*, en remplaçant la séquence codante de *GAL4-RAR* par celle de *GAL4-TR α* (Flamant and Samarut, 1998). Pour activer l'expression de *pFindT3*, la présence concomitante de T3 et de coactivateurs sont nécessaires. Le système fonctionne indépendamment de la présence des TR endogènes. Il a été testé *in vitro*. Des cellules COS7 exprimant *pFindT3* de façon transitoire ont été cultivées en présence de différentes concentrations de T3 dans le milieu de culture (10^{-11} à 10^{-7} M). Le niveau d'expression du gène *LacZ* augmente de façon proportionnelle à la concentration de T3.

pFindT3 a été micro-injecté dans des ovocytes de souris par le service transgénèse de l'ENS. Deux souris transgéniques exprimant le transgène ont fondé les deux lignées *FindT3A* et *FindT3B*. Elles ont intégré de façon aléatoire dans leur génome respectivement cinq et dix copies du plasmide *pFindT3*. Dans le cerveau, l'expression de la *LacZ* est forte dans les deux lignées, notamment dans le cortex antérieur et les colliculus. Par contre, l'expression de *pFindT3* est très faible dans le foie, le cœur, la rate, la thyroïde, la peau, les reins, les ovaires et les muscles. Il existe deux exceptions□*pFindT3* s'exprime dans les spermatogonies et la rétine.

Les hétérodimères TR / RXR étant quasiment ubiquitaires dans le cerveau, l'expression de *pFindT3* devrait effectivement refléter la signalisation de T3 dans cette structure. Des tests au Xgal réalisés sur des cerveaux *FindT3A* et *FindT3B* entiers ou des coupes coronales à P2, P8 et P15 montrent que l'expression du gène *LacZ* est comparable dans les deux lignées. Le transgène s'exprime essentiellement dans les neurones, selon un patron très hétérogène. Afin de vérifier que l'expression de *LacZ* dépend effectivement de la disponibilité de T3 *in vivo*, les souris *FindT3B* ont été croisées avec les souris *Pax8^{-/-}*, dépourvues de glande thyroïde. A P8, l'expression du gène *LacZ* est très faible dans le cerveau des souris *FindT3B Pax8^{-/-}*. De plus, nous avons vérifié que les régions cérébrales dans lesquelles l'activité de la β GALACTOSIDASE n'est pas détectée sont capables d'exprimer *pFindT3*. Les souris *FindT3B* ont été rendues hyperthyroïdiennes par des injections quotidiennes de T3 et T4 pendant cinq jours. A P15, *pFindT3* s'exprime alors dans certaines cellules des lobes olfactifs et de la couche granulaire externe du cervelet, dans lesquelles l'expression du transgène n'est pas détectée chez les souris *FindT3* euthyroïdiennes. Dans le cerveau, l'expression de *pFindT3* est donc effectivement régulée par T3. Le système a donc été utilisé pour déterminer le patron d'activité cérébral de T3.

Des test au Xgal sur les embryons entiers ou les cerveaux isolés montrent une expression de *pFindT3* dès E15,5 dans le cerveau moyen pour les deux lignées. Or la thyroïde de l'embryon n'est fonctionnelle qu'à E18,5 (Obregon et al., 1984). La T3 active à E15,5 est donc maternelle ou synthétisée localement à partir de la T4 maternelle.

L'hétérogénéité de la signalisation de T3 dans le cerveau peut s'expliquer par la distribution hétérogène de l'hormone. T3 a été dosée dans trois régions du cerveau sa concentration est élevée dans le cortex antérieur (1500 fmol/g) et les colliculus (6000 fmol/g), où l'expression de *pFindT3* est forte. Au contraire sa concentration est faible dans le cervelet (500 fmol/g), où l'expression de *pFindT3* est faible. Les données publiées semblent indiquer une coïncidence entre l'expression du transgène et l'expression de la *D2* et de la *D3* (Guadano-Ferraz et al., 1997a ; Tu et al., 1999). Pour compléter ces données, le patron d'expression des déiodases a été déterminée *in situ* dans le cerveau embryonnaire à E15,5. Par RT-PCR quantitative, leur niveau d'expression a été quantifié à E15,5 et P15 dans différentes régions cérébrales. Le patron d'expression de la *D3* dans le cerveau embryonnaire et de la *D2* dans le cerveau post-natal sont partiellement corrélés au patron d'activité de T3.

Grâce au système *FindT3*, deux résultats nouveaux ont été obtenus : T3 agit très tôt sur le développement du cerveau embryonnaire, et son action dans le cerveau post-natal est extrêmement hétérogène. Certains résultats sont assez inattendus. Par exemple, dans le cervelet, T3 est active uniquement dans certaines cellules de la couche granulaire externe, jusqu'à P15, et dans les cellules de Purkinje. Ces deux types cellulaires sont des cibles connues de T3. Mais le cervelet étant très sensible à l'hypothyroïdie, une expression plus étendue de *pFindT3* pouvait être attendue. Dans cette structure, T3 pourrait agir indirectement, par le biais d'interactions cellulaires.

T3 est considérée comme un facteur trophique dans le cerveau post-natal. Or elle est active localement dans le mésencéphale de l'embryon à E15,5. L'acide rétinoïque agit *via* les récepteurs nucléaires RAR, très similaires des TR. La signalisation de RAR contribue par de nombreux aspects au développement du système nerveux central. Dans le cerveau embryonnaire postérieur, une concentration forte d'acide rétinoïque spécifie les rhombomères postérieurs (Maden, 2002). Les résultats obtenus avec le système *FindT3* montrent que la signalisation de T3 varie à de faibles distances dans le cerveau fœtal. Nous proposons que la concentration locale de T3, comme celle de l'acide rétinoïque, puisse être informative durant le développement embryonnaire du cerveau. T3 agit trop tardivement pour spécifier l'aire du mésencéphale, qui est différenciée à E15,5. Elle pourrait déterminer le devenir d'une sous population de neurones.

C. Article 1

Référence :

Quignodon L., Legrand, C., Allioli N., Guadano-Ferraz A., Bernal J., Samarut J. and Flamant F (2004). Thyroid hormone signaling is highly heterogeneous during pre- and postnatal brain development. *J Mol Endocrinol*. 2004 Oct;33(2):467-76.

Frédéric Flamant a généré les souris *FindT3* et je les ai analysées. L'expression des déiodases a été quantifiée par Nathalie Allioli, et leur patron déterminé *in situ* par Ana Guadano-Ferraz et Juan Bernal.

D. Commentaires

La première limite du système *FindT3* est un défaut d'expression dans la plupart des organes périphériques. Les transgènes *pFindRAR* et *pFindRXR* s'expriment aussi seulement dans les neurones (Mata De Urquiza et al., 1999). Le promoteur minimal *hsp68* n'est pas le seul responsable car le système rapporteur *RARE hsp68 LacZ* s'exprime dans les somites (Niederreither et al., 2002). Pour l'instant il est difficile d'exclure totalement que certains neurones soient réfractaires au fonctionnement du système rapporteur. Toutefois, *pFindRAR* et *pFindRXR* s'expriment dans la moelle épinière en région thoracique et dans certaines cellules du cerveau antérieur dès E12,5 (Mata De Urquiza et al., 1999), ce qui montre que le système *pFind* est capable de fonctionner dans ces cellules. Pour prouver que *pFindT3* peut s'exprimer dans tous les neurones, les souris *FindT3* devraient être croisées avec des souris transgéniques exprimant GAL4 de façon panneurale. GAL4 étant constitutivement actif, il devrait induire l'expression de *pFindT3* dans toutes les cellules nerveuse. Nous avons pensé au transgène *GAL4VP16*, mais il semble qu'il soit toxique.

La seconde limite est une influence possible du site d'intégration sur l'expression du transgène. Les copies de *pFindT3*, intégrées de façon indépendante dans le génome des deux géniteurs *FindT3A* et *FindT3B*, sont situées dans deux locus différents. Les régions où l'expression du transgène est influencée par le site d'intégration sont celles où le patron diffère entre les deux lignées. Des tests au Xgal montrent que le patron d'expression de *pFindT3* est similaire dans les cerveaux des deux lignées à P2, P8 et P15, hormis trois exceptions : *pFindT3* s'exprime davantage dans les colliculi inférieurs et dans le pont des souris *FindT3A*, tandis que seul le transgène *FindT3B* s'exprime dans les cellules de Purkinje. Cette dernière différence est particulièrement regrettable étant donné que ces cellules pourraient être la cible directe de T3 pour induire la migration des cellules granulaires externes. Malgré tout, le site d'intégration influence peu l'expression post-natale du transgène. Chez les embryons *FindT3A* et *FindT3B*, bien que le patron d'expression de *LacZ* soit similaire dans les cerveaux, il diffère dans les organes périphériques, en particulier dans l'épiderme où l'expression du gène *LacZ* est beaucoup plus forte dans la lignée *FindT3A*.

La troisième limite est inhérente au système rapporteur, qui teste seulement la présence de T3 et de cofacteurs. Étant donné l'importance des *TRE* et de la conformation de la chromatine dans le promoteur des gènes-cibles de T3 (cf. introduction II. C. a), le transgène

rapporteur ne permet pas d'intégrer l'ensemble des régulations exercées par les différents acteurs de la signalisation de T3. Il permet cependant de montrer que la signalisation de T3 est hétérogène dans le cerveau pré et post-natal.

E. Résultats non publiés

L'objectif était de comprendre pourquoi cette signalisation est hétérogène. Le système *FindT3* teste la présence de T3 et de cofacteurs dans une cellule. La disponibilité de T3 semble un facteur explicatif important. En effet, même si les deux patrons ne se superposent pas exactement, le patron d'expression de *pFindT3* est assez bien corrélé à la distribution de l'hormone dans le cerveau (Rozanov and Dratman, 1996). Les déiodases contribueraient à générer cette distribution hétérogène. La disponibilité locale de l'hormone dépend également de son transport à l'échelle tissulaire et cellulaire. Elle serait véhiculée le long des axones des neurones (Gordon et al., 1999). De plus, son entrée dans la cellule est régulée par des transporteurs membranaires. Afin de déterminer quelle est la part respective du corépresseur HAIRLESS, des déiodases et du transport de l'hormone dans l'élaboration du patron de signalisation de T3, ces différents facteurs ont été perturbés chez les souris *FindT3*.

a. Implication d'HAIRLESS

Le corépresseur HAIRLESS est le cofacteur le plus spécifique de TR. De plus, il serait impliqué dans un mécanisme de régulation négative de l'action de T3 dans le cerveau post-natal. Il est fortement exprimé dans le cervelet, en particulier dans les cellules de la couche granulaire interne (Potter et al., 2002). Or l'expression de *pFindT3* est très faible dans ces cellules. Pour déterminer si HAIRLESS inhibe localement la signalisation de T3, les souris *FindT3A* et *FindT3B* ont été croisées avec des souris qui possèdent une mutation spontanée, due à l'insertion du virus de la leucémie murine, réduisant de 95% l'expression d'*Hairless* (Charles River). Un test au Xgal réalisé sur des coupes de cerveau montre que le patron d'expression de *pFindT3* n'est pas modifié à P15 et à P21. HAIRLESS n'est donc pas le seul facteur qui inhibe la signalisation de T3 dans le cervelet ; d'autres corépresseurs compensent sans doute son action.

b. Implication des DEIODASES

Le transgène *FindT3* a été introduit chez des souris invalidées pour la *D2* (Schneider et al., 2001). A E15,5, P0, P8, P15 et P21, nous n'avons observé aucune modification du patron d'activité de T3. La *D2* n'est donc pas nécessaire pour générer la signalisation hétérogène de T3 dans le cerveau.

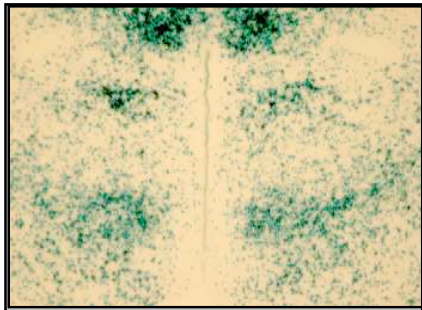
Selon la même approche, Arturo Hernandez, Anne Galton et Donald Saint Germain de l'Université Libanon (New Hampshire, USA), ont introduit le transgène rapporteur chez des souris invalidées pour la *D3* (Hernandez et al., 2006). A P15, l'expression du gène rapporteur *LacZ* est diminuée dans le cortex, l'hippocampe et l'aire préoptique de l'hypothalamus, tandis qu'elle est augmentée dans le thalamus, les colliculi et le pont (figure 18). La délétion de la *D3* (*D3*^{-/-}) induit donc des dérégulations locales de la signalisation de T3. Chez l'adulte, l'expression de *LacZ* augmente au cours du temps, si bien que la plupart des régions apparaissent hyperthyroïdiennes à P240. Malgré une hypothyroïdie périphérique (Hernandez et al., 2006), le cerveau des souris adultes *D3*^{-/-} est donc soumis à une concentration croissante de T3. Ces données montrent que la *D3* est nécessaire pour limiter l'action de T3 à certaines structures du cerveau (Arturo Hernandez, abstract for ATA meeting, 2006). Une partie de l'hétérogénéité du patron d'activité de T3 s'explique donc par l'action locale de cette enzyme.

c. Transport de l'hormone

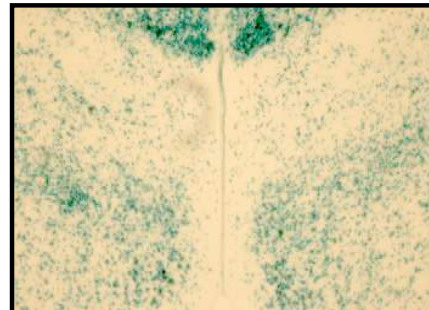
Pour tester l'implication du transport axonal, nous avons tenté de reproduire l'expérience de Gordon et al. (Gordon et al., 1999) en détruisant spécifiquement les neurones noradrénergiques du locus coeruleus qui transporteraient T3. Pour cela, dix souris *FindT3A* et *FindT3B* ont reçu une injection intrapéritonéale de 100 µl/10g d'une drogue spécifique, le DSP-4 [N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-bromobenzyl] (Research biochemicals Inc.) à 8 mg/ml dans du PBS. Sur des coupes de cerveau, aucune modification du patron d'expression du transgène n'a été observée à P15. Mais les souris traitées ne présentaient pas le déficit de

A. Aire préoptique
P15

FindT3B D3^{+/+}

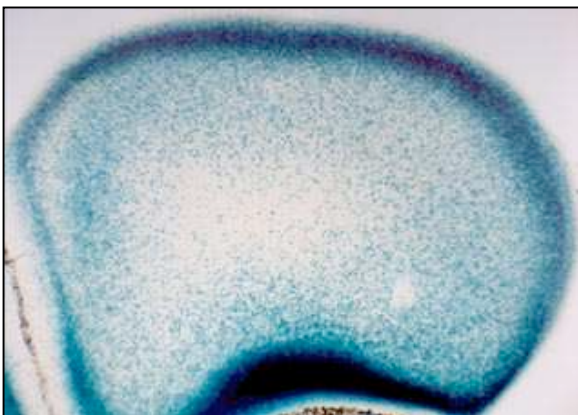


FindT3B D3^{-/-}



B. Cortex préfrontal
P240

FindT3B D3^{+/+}



FindT3B D3^{-/-}

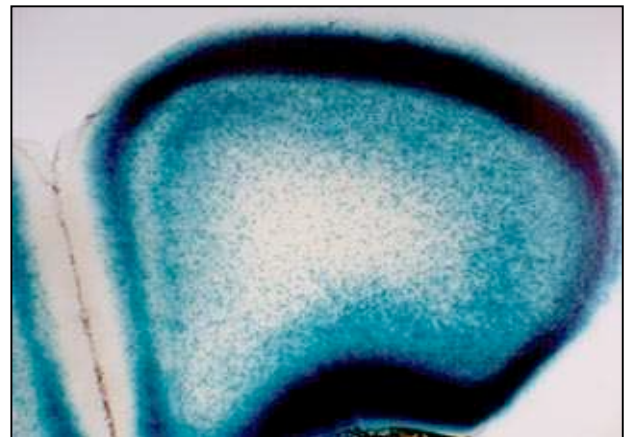


Figure 18 : La délétion de la *D3* perturbe la signalisation de T3 dans le cortex post-natal et adulte

Résultats obtenus par Arturo Hernandez et al. (2006)

Dans le cerveau des souris transgéniques *FindT3B*, l'expression du gène rapporteur *LacZ* correspond aux régions où T3 est active. Un test Xgal réalisé sur des coupes coronales de cortex montre que la délétion de la *Déiodase 3* (*D3^{-/-}*) perturbe le patron d'activité de T3, notamment dans l'aire préoptique à P15 (A) et dans le cortex préfrontal à P240 (B).

proprioception typique d'une lésion du locus cœruleus. L'efficacité du DSP-4 utilisé est donc incertaine.

Le transport intracellulaire de l'hormone peut contribuer à réguler l'activité de TR dans une cellule. Afin de tester cette hypothèse, le transgène rapporteur *FindT3* a été introduit chez des souris dont le gène *MCT8* a été invalidé (Dumitrescu et al., 2006). Bien que des mutations de ce gène soient associées chez l'homme à un retard mental sévère et une concentration élevée de T3 dans le sérum (Jansen et al., 2005), l'inactivation de *MCT8* chez la souris reproduit l'augmentation de T3 circulante mais non le phénotype cérébral. Les souris *FindT3* auraient pu permettre d'observer des dérégulations de la signalisation de T3 spécifiquement dans certaines régions du cerveau. Cependant aucune différence majeure n'a été observée dans l'expression du transgène rapporteur chez les souris *MCT8*^{-/-} par rapport aux contrôles à P15. L'analyse n'a peut-être pas été assez détaillée, puisqu'il a été récemment décrit une réduction significative du niveau d'expression de *RC3*, un gène-cible de T3, uniquement dans les neurones du striatum des mâles adultes (Trajkovic et al., 2007)

d. Conclusion

Le transgène rapporteur *FindT3* met en évidence une signalisation hétérogène de T3 dans le cerveau pré et post-natal. Cette signalisation est extrêmement stable, puisque les différentes approches utilisées pour le perturber ont toutes échoué, hormis la délétion de la *D3*. A l'heure actuelle, nous ne pouvons donc pas expliquer pourquoi l'action de T3 est spécifiquement restreinte à certaines cellules nerveuses.

II. L'aporécepteur $TR\alpha$ est un modificateur moléculaire de la fonction cardiaque entre la vie fœtale et la vie post-natale

A. Démarche scientifique

Le cœur est un organe-cible de $TR\alpha$ 1. A 2 mois, les souris $TR\alpha^{1-/-}$ sont bradycardes, leur fréquence cardiaque est réduite de 20% (Wikstrom et al., 1998). En réponse à des injections d'hormone thyroïdienne, la fréquence cardiaque des souris $TR\alpha^{1-/-}$ augmente de façon comparable à ce qui est observé pour les souris sauvages. Ce résultat suggère que $TR\beta$ est l'effecteur de la réponse cardiaque à des doses supraphysiologiques de T3 (Weiss et al., 1998) ou que des effets non génomiques sont impliqués (Storey et al., 2006). La bradycardie des souris $TR\alpha^{1-/-}$ résulte d'une augmentation de la durée du potentiel d'action monophasique (Johansson et al., 1998), liée à la dérégulation de l'expression de différents canaux sodiques et potassiques dans le cœur, dont *HCN2*, *KCNE1*, *KCNB1*, *KCNA5* et *KCNQ1* (Gloss et al., 2001; Le Bouter et al., 2003).

Afin d'étudier le rôle de $TR\alpha$ sur la fonction cardiaque, Wilfried Mai a réalisé des échographies cardiaques cinétiques sur les souris $TR\alpha^{0/0}$. Les adultes souffrent de bradychardie (350 battements par minute contre 450 pour les contrôles). Par contre, de façon surprenante, les embryons sont tachycardes (à E9,5 150 battements par minutes contre 100 pour les contrôles). L'expression des gènes-cibles *HCN2*, *KCNE1*, *KCNB1* et *KCNA5*, est augmentée dans le cœur des foeti $TR\alpha^{0/0}$ par rapport aux foeti sauvages à E15,5. $TR\alpha$ réprime donc l'expression de ces gènes à E15,5. *HCN2* est un gène réprimé par l'aporécepteur $TR\alpha$ chez les souris hypothyroïdiennes adultes (Flamant et al., 2002). Il est concevable qu'il soit réprimé physiologiquement par l'aporécepteur $TR\alpha$ chez les embryons, dans lesquels la concentration de T3 est faible (Obregon et al., 1984).

B. Résumé de l'article 2

Cet article démontre que $TR\alpha$ est un inducteur moléculaire de la fonction cardiaque entre la vie fœtale et la vie post-natale.

La fréquence cardiaque des foeti sauvages est faible à E9,5 (100 battements par minute), elle augmente lentement jusqu'à E17,5 (200 battements par minute) puis s'accélère plus rapidement en fin de gestation. A P18 la fréquence cardiaque est de 350 battements par minute, elle n'a pas encore atteint sa valeur adulte de 450 battements par minutes. Les niveaux d'expression de *THRB* et des gènes-cibles de T3, *HCN2*, *KCEN1*, *KCNB1* et *KCNA5* sont élevés jusqu'à P18 puis ils diminuent chez l'adulte, hormis pour *KCNA5*. L'expression de *KCNQ1* décroît de façon continue depuis la période fœtale jusqu'à la période adulte.

De E9,5 à P18, la fréquence cardiaque des souris *TRα^{0/0}* est plus élevée que celles des souris sauvages. Des expériences de RT-PCR quantitatives montrent que les gènes *HCN2*, *THRB*, *KCEN1*, *KCNB1*, *KCNA5* et *KCNQ1* sont surexprimés de 2 à 6 fois chez les foeti *TRα^{0/0}* par rapport aux foeti sauvages à E15,5. Pour prouver que TRα réprime l'expression de ces gènes-cibles pendant le développement fœtal normal, de la T3 a été administrée de façon chronique à la mère. Dans le cœur des foeti sauvages ce traitement conduit à une augmentation de 2 à 6 fois de l'expression des gènes-cibles cardiaques à E15,5. *KCNQ1* fait exception à cette règle. Cet effet n'est pas observé chez les foeti *TRα^{0/0}*. Expérimentalement, l'administration de T3 permet donc de lever l'effet répresseur exercé par TRα sur l'expression de *HCN2*, *THRB*, *KCEN1*, *KCNB1* et *KCNA5*. Cette expérience démontre que TRα a un rôle aporécepteur physiologique pendant le développement du cœur fœtal. Cette étude est la première à démontrer que le récepteur TRα exerce une action physiologique en absence de son ligand.

A P18 et chez l'adulte âgé de 11 semaines, la fréquence cardiaque des souris *TRα^{0/0}* est au contraire diminuée par rapport aux souris sauvages. Des expériences de RT-PCR quantitative montrent que les gènes-cibles cardiaques de T3 sont sous-exprimés chez les souris *TRα^{0/0}*. TRα active donc leur expression pendant le développement post-natal et adulte. P18 correspond à un pic de T3 dans le sérum. TRα est donc transformé en holorécepteur, ce qui conduit à activer l'expression des gènes-cibles et la fréquence cardiaque. Ainsi la conversion de TRα de la forme aporécepteur à la forme holorécepteur permet de potentialiser la modification de la fréquence cardiaque entre la vie fœtale et la vie adulte. TRα est donc un inducteur moléculaire majeur du développement de la fonction cardiaque.

C. Article 2

Référence :

Mai W, Janier MF, Allioli N, Quignodon L, Chuzel T, Flamant F, Samarut J. (2004). Thyroid hormone receptor alpha is a molecular switch of cardiac function between fetal and postnatal life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10332-7.

Ma participation a consisté à terminer les mesures de fréquences cardiaques embryonnaires, avec l'aide d'un spécialiste de l'échographie cardiaque, et à aider Nathalie Allioli pour prélever les cœurs embryonnaires, extraire les ARN et réaliser les PCR quantitatives mesurant l'expression des différents gènes-cibles de TR α .

III. Identification des gènes-cibles directs T3 dans le cervelet post-natal

A. Démarche scientifique

Etudier l'action de T3 sur le développement du cervelet est une voie d'approche originale pour comprendre les mécanismes basiques du neuro-développement. Comme l'hypothyroïdie perturbe la migration des cellules granulaires externes pendant la période post-natale, la recherche des gènes-cibles de T3 doit permettre d'identifier des gènes cruciaux pour la migration neuronale.

Un gène-cible de T3 est un gène dont l'expression est diminuée chez les souris hypothyroïdiennes et augmentée si ces souris ont reçu de l'hormone thyroïdienne exogène. Un gène-cible direct est un gène qui possède un ou plusieurs *TRE* sur lequel TR se fixe pour réguler directement son expression. Jusqu'à présent, aucune étude n'a identifié l'ensemble des gènes-cibles directs de T3 dans le cervelet post-natal. Dong et al. (Dong et al., 2005) ont seulement défini la signature du statut hypothyroïdien. Ils ont comparé le transcriptome cérébelleux à P15 de souris sauvages et rendues hypothyroïdiennes par administration de PTU à la mère gestante puis allaitante. 204 gènes ont un niveau d'expression significativement altéré. Cependant ces gènes n'ont pas été confirmés comme activés ou réprimés par l'administration de T3. Or, il a été montré que très peu de marqueurs d'hypothyroïdie le sont dans le cervelet (Miller et al., 2004) ou le cerveau entier (Poguet et al., 2003). Il n'existe donc aucune preuve que ce sont des gènes-cibles directs de T3.

De même, concernant des études ciblées, les preuves d'une régulation directe manquent souvent. Par exemple, *Pcp2* (*Purkinje Cell Protein*), est connu pour être réprimé lors d'hypothyroïdie (Strait et al., 1992). Une expérience d'immunoprécipitation anti-TR a montré que TR n'est pas fixé sur son promoteur tandis que ROR α , lui, est présent (Gold et al., 2003). Il s'agit vraisemblablement d'un gène-cible indirect de T3. A ce jour, seuls *Hairless* (Engelhard and Christiano, 2004), *Sygr1* (Potter et al., 2001a), *RC3/neurogranine* (Guadano-Ferraz et al., 1997b; Morte et al., 1997), *BTEB* (Denver et al., 1999) et *Rhes* (Vargiu et al., 2001) ont été identifiés comme des gènes-cibles directs dans le cervelet post-natal.

Afin d'identifier les gènes-cibles directs de T3 dans le cervelet post-natal, nous avons utilisé le modèle de souris *Pax8*^{-/-}. En effet, il constitue à ce jour le seul modèle d'hypothyroïdie congénitale totalement dépourvu d'hormone thyroïdienne. Différentes souris invalidées pour *THRA* et / ou *THRB* ont été générées dans la laboratoire, mais la délétion des TR n'induit pas de phénotype cérébelleux marqué, c'est pourquoi il est difficile d'identifier les gènes-cibles à partir de ces modèles.

B. Résumé de l'article 3

Cet article montre que des approches combinées permettent d'identifier un nombre restreint de gènes-cibles directs de T3 dans le cervelet post-natal.

Dans un premier temps, des puces à ADN ont été utilisées pour comparer à P8 et P15 le transcriptome de cervelets post-natal de souris sauvages, *Pax8*^{-/-} et *Pax8*^{-/-} ayant reçu pendant 2 jours une injection quotidienne de T3 (0,2 µg/g). Un nombre restreint de gènes régulés par T3 a été identifié. Comme il est connu que le cerveau est protégé des brusques augmentations de T3, notamment par l'activation de la D3 (Galton, 2005), une autre approche a été mise en oeuvre. Des puces à ADN ont été utilisées pour comparer le transcriptome de cultures primaires de neurones de cervelet, traitées ou non à T3. Afin d'identifier des gènes-cibles directs, les neurones ont été exposés à 10⁻⁷ M de T3 pendant seulement 6 heures en présence de cycloheximide, un inhibiteur de traduction. Un certain nombre de gènes-cibles supplémentaires a été ainsi identifié. Cependant la plupart ne sont pas sous-exprimés dans les cervelets *Pax8*^{-/-} par rapport aux sauvages, ils sont seulement activés par le traitement à T3. Ceci suggère qu'ils sont régulés par des concentrations supra-physiologiques d'hormone thyroïdienne. Ce sont des marqueurs d'hyperthyroïdie. Enfin, une approche bio-informatique a été utilisée pour prédire les gènes-cibles directs. Quatre critères ont été utilisés pour identifier dans le génome des *TRE* fonctionnels dans le cervelet.:

1. Un motif consensus *DR4*, *ER6* ou *IR0* est situé à proximité du promoteur du gène.
2. Cet élément est conservé chez les mammifères, c'est-à-dire présent à la fois dans le génome murin et dans le génome humain.
3. Le gène-cible prédit est exprimé dans le cervelet post-natal
4. Il a une fonction connue sur le neurodéveloppement ou la différenciation des cellules nerveuses.

Parmi les dix-neuf gènes retenus, des expériences de PCR quantitatives ont montré qu'un seul d'entre eux, *Tgml*, a effectivement une expression régulée par T3 dans le cervelet post-natal ou les cultures primaires de neurone.

Au final, une expérience de retard de migration sur gel et une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine ont confirmé la fixation de TR sur les *DR4* putatifs de six gènes dont l'expression est régulée par T3 : *Akap1*, *Hbb-a*, *Hairless*, *Mrg1*, *Tgml*, *Cdh1*. Les différentes stratégies utilisées ont toutes menées à la même conclusion□le nombre de gènes-cibles directs de T3 apparaît restreint dans le cervelet post-natal.

C. Article 3

Référence :

Quignodon L., Grijota C., Allioli N., Walker R., Meltzer P., Mader S., Jacques Samarut J. and Flamant F. A combined approach identifies a limited number of new thyroid hormone target genes in post-natal mouse cerebellum. Accepted for publication in *J Mol Endocrinol*.

Cet article a été accepté pour publication dans Journal of Molecular Endocrinology en Avril 2007. En collaboration avec Robert Walker et Paul Meltzer, les expériences de puces à ADN sur cervelet ont été réalisées par Frédéric Flamant. Les puces à ADN sur les cultures primaires de neurones ont été effectuées par Nathalie Aillioli. Frédéric Flamant et moi avons réalisé les expériences de RT-PCR quantitative. Avec Carmen Grijota, j'ai réalisé les cultures primaires de neurones. La prédiction bioinformatique a été effectuée par Sylvie Mader. Romain Guyot a réalisé les expériences de retard de migration sur gel. Emmanuel Compe (IGBMC, Strasbourg) a réalisé les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

IV. Génèse d'un nouveau modèle de souris mutantes conditionnelles pour le récepteur $TR\alpha 1$

A. Démarche scientifique

La suppression de la réponse à l'hormone thyroïdienne dans une catégorie spécifique de cellules nerveuses permettrait de déterminer ses actions directes et indirectes. La suppression de la réponse à l'hormone thyroïdienne à différents stades (embryonnaire, post-natal) permettrait de comprendre quels sont les gènes-cibles initialement dérégulés dans le cervelet hypothyroïdien. Des souris mutantes possédant un système d'inactivation conditionnelle de la signalisation de T3 ont donc été générées. L'objectif est de supprimer la réponse à l'hormone dans une cellule donnée, à un moment donné du développement, par expression d'un $TR\alpha 1$ mutant à effet dominant négatif. Parmi 12 mutations étudiées de $TR\beta$, nous avons choisi la mutation qui a l'effet dominant négatif le plus fort dans un test de transactivation d'un gène rapporteur (Feng et al., 1998 □ Darimont et al., 1998). Cette mutation abolit les interactions avec les coactivateurs à activité histone acétyltransférase. Dans $TR\alpha 1$, elle correspond à la transformation de la leucine 400 en arginine. Elle devrait induire un phénotype visible même lorsqu'une fraction minoritaire des cellules est ciblée. Afin de l'exprimer de façon conditionnelle, le système $CRE/loxP$ a été utilisé.

B. Résumé de l'article 4

Cet article montre que l'expression constitutive du récepteur $TR\alpha 1L400R$ chez la souris récapitule partiellement l'hypothyroïdie congénitale et adulte. Le système $TR\alpha^{AMI}$ ($AMI = \text{Alpha Muté Inductible}$) permet d'exprimer le récepteur muté de façon conditionnelle. Il constitue donc un outil puissant pour comprendre les actions pléiotropiques de T3 pendant le développement et chez l'adulte.

La mutation L400R a été introduite dans la séquence de l'ADN complémentaire de $TR\alpha 1$ par mutagénèse dirigée. Par expression transitoire dans des cellules COS, nous avons comparé les activités du récepteur sauvage $TR\alpha 1$ et du récepteur mutant $TR\alpha 1L400R$ sur l'expression d'un gène rapporteur $TRE\text{-}Luciférase$. Le récepteur sauvage $TR\alpha 1$ active de

quatre fois l'expression de la LUCIFERASE en présence de 10^{-7} M de T3. Le récepteur mutant n'a pas d'activité de transactivation. Quand les deux récepteurs sont coexprimés, le récepteur mutant inhibe l'action du récepteur sauvage de façon dose dépendante. A concentration égale, l'activité du récepteur sauvage est complètement abolie. TR α 1L400R a donc un effet dominant négatif. Des expériences de double hybride dans des levures ont confirmé que la mutation empêche le récepteur d'interagir avec les coactivateurs SRC1 et SRC2. Contrairement à ce qui est observé pour le récepteur sauvage TR α 1, TR α 1L400R interagit avec le corépresseur NCOR même en présence de T3.

Un vecteur d'expression conditionnelle a été construit. Il permet d'exprimer de façon conditionnelle TR α 1L400R ainsi qu'un gène rapporteur *Tau-LacZ*. La protéine TAU se fixe spontanément sur les microtubules, la protéine fusion TAU- β GALACTOSIDASE permet donc de visualiser le cytosquelette des cellules, notamment des neurones. La séquence *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*) permet d'initier la traduction à l'intérieur d'un transcrit. Son utilisation a permis de placer les deux gènes sur un seul et même élément transcriptionnel bicistronique \square *THRAL400R IRES Tau-LacZ*. L'expression conditionnelle repose sur l'utilisation du système CRE/*loxP* \square en amont de la séquence *THRAL400R IRES Tau-LacZ*, la construction possède une cassette floxée contenant le gène de résistance à la néomycine *NeoR* et un signal de polyadénylation qui arrête la transcription. Cette cassette bloque donc l'expression de TR α 1 muté et du gène rapporteur. Lorsque la recombinase CRE est exprimée, la cassette floxée est excisée, ce qui déclenche l'expression de TR α 1L400R et de TAU- β GALACTOSIDASE. La construction a été introduite en aval d'un promoteur *CMV* et testée par expression transitoire dans des cellules COS. La délétion de la cassette *NeoR* floxée déclenche effectivement l'expression de TR α 1L400R et de TAU- β GALACTOSIDASE.

Afin d'introduire cette construction dans le locus *THRA*, elle a été clonée entre deux bras de recombinaison homologue. La recombinaison homologue a été réalisée dans des cellules souches embryonnaires. Trois clones cellulaires ont été confirmés comme étant effectivement recombinants. Ils ont été injectés dans des blastocystes, ce qui a conduit à une première génération de souris chimères. La transmission germinale de la mutation a permis d'obtenir les fondateurs de la lignée de souris TR α ^{AMT}.

En croisant les souris TR α ^{AMT} avec les souris possédant un transgène *SYCP1Cre*, qui induit l'expression de la CRE dans le spermatocyte I (Chung et al., 2004), des mutants

constitutifs hétérozygotes ($TR\alpha^{AM/+/xS}$) ont été générés. Leur phénotype est, comme attendu, très proche de l'hypothyroïdie. 48% des mutants n'atteignent pas l'âge adulte. Ils souffrent d'un retard de croissance important □ leur poids est réduit de moitié, l'ossification est retardée et le niveau d'expression de GH est réduit de 55% par rapport aux souris sauvages à P15. Dans le cœur, l'expression des gènes-cibles de T3 *HCN2* et *KCNB1* est effondrée. De même, la mutation induit une forte répression de l'expression d'*Hairless* et de *Pcp2*, des gènes-cibles de T3 dans le cervelet post-natal. L'arborisation des cellules de Purkinje est réduite. A P21, la couche granulaire externe du cervelet persiste de façon anormale. Les niveaux d'expression de la *DI* dans le foie, de l'*Opsine M* et de l'*Opsine S* dans la rétine ne sont pas modifiés, sans doute en raison de l'expression majoritaire de *THRB* par rapport à celle de *THRA* dans ces organes.

Les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$ adultes survivantes ne sont pas obèses, contrairement à la lignée $TR\alpha^{P398H/+}$ (Liu et al., 2003). Elles ont une fréquence cardiaque ralentie. Un test de tolérance au froid montre qu'elles sont incapables de maintenir leur température corporelle lorsqu'elles sont exposées quelques heures à 4°C.

Les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$ ont donc un phénotype très proche de l'hypothyroïdie congénitale, hormis dans les organes qui expriment majoritairement *THRB*. Ce phénotype n'est pas du à une dérégulation de l'axe thyroïdien, puisque les niveaux de T3, T4 et TSH ne sont quasiment pas modifiés par rapport aux témoins à P15 et chez l'adulte. Ceci confirme que la pathogénie de l'hypothyroïdie est essentiellement due à l'aporrécepteur $TR\alpha 1$.

En croisant la lignée $TR\alpha^{AM/}$ avec la lignée *CagCreERTM* (Hayashi and McMahon, 2002), nous avons obtenu des souris $TR\alpha^{AM/+/x}CagCreERTM$ exprimant $TR\alpha 1L400R$ de façon ubiquitaire et inductible par le tamoxifène. Chez ces souris, l'administration de tamoxifène à E17,5 provoque un retard de croissance et un retard d'ossification moins importants que ceux observés chez les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$. A P21 la couche granulaire externe persiste de façon plus hétérogène. Le phénotype des souris $TR\alpha^{AM/+/x}CagCreERTM$ exposées au tamoxifène à E17,5 est donc moins sévère que le phénotype des souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$. Ceci est probablement dû à l'efficacité partielle de la CREERTM, évaluée entre 10 et 60% selon les tissus.

L'expression de la mutation a également été induite à l'âge adulte, par injection de tamoxifène à des souris $TR\alpha^{AM/+/x}CagCreERTM$ de 2 mois. Elle provoque une bradycardie sévère. $TR\alpha 1$ a donc un effet direct sur le cœur adulte. Cet exemple montre que le système

d'expression conditionnel $TR\alpha^{AMT}$ permet de séparer les effets développementaux des effets de T3 à l'âge adulte.

C. Article 4

Référence :

Quignodon L., Vincent S., Winter H., Samarut J. and Flamant F. A point mutation in the AF-2 domain of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ expressed after CRE mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. Accepted for publication in *Molecular Endocrinology*.

Cet article a été accepté pour publication dans le journal *Molecular Endocrinology* en Juillet 2007. Séverine Vincent a réalisé les tests de double hybride en levure. Les cellules embryonnaires souches recombinantes ont été injectées dans les ovocytes par le service transgénèse du PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris), à l'ENS de Lyon. Harald Winter a réalisé les immunohistochimies de l'oreille interne. J'ai réalisé les autres expériences.

D. Résultats non publiés

a. Perturbation transcriptionnelle dans les cervelets $TR\alpha^{AM/+}xS$ à P15

Afin d'analyser plus en détail le phénotype cérébelleux des souris $TR\alpha^{AM/+}xS$, l'expression des nouveaux gènes-cibles de T3 identifiés dans l'article 3 a été mesurée par PCR quantitative. A P15 l'expression de *Mrg1* est significativement augmentée (figure 19 A).

D'autre part, je me suis intéressé à une protéine qui régule la prolifération des cellules granulaires externes □ SONIC HEDGEHOG (SHH) (Stecca and Ruiz i Altaba, 2005). Sur des explants primaires, SHH induit la prolifération des précurseurs des cellules granulaires et les maintient dans un état indifférencié, tandis qu'un anticorps anti SHH réduit leur prolifération. *In vivo*, l'inhibition de SHH réduit la prolifération des cellules granulaires externes (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999 □ Wallace, 1999 □ Wechsler-Reya and Scott, 1999). De plus, SHH favorise la différenciation de la glie de Bergmann (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999). Son ablation génétique réduit le volume cérébelleux et sa foliation (Lewis et al., 2004).

Dans le cervelt de souris $TR\alpha^{AM/+}xS$, le niveau d'expression de SHH est diminué de moitié à P15 (figure 19 B). Son implication dans le phénotype cérébelleux hypothyroïdien sera discutée dans la dernière partie (discussion II).

b. Métabolisme glucidique

Ces travaux, réalisés avec Karine Gauthier, chargée de recherche dans l'équipe de Jacques Samarut, montrent que l'expression constitutive de $TR\alpha^{1L400R}$ induit une clairance accélérée du glucose. Ce sont des données préliminaires qui ne permettent pas encore de comprendre les mécanismes impliqués.

1. Introduction

L'augmentation des réserves de glycogène hépatique est un symptôme d'hypothyroïdie (Weiss et al., 1998), car T3 augmente l'absorption intestinale du glucose

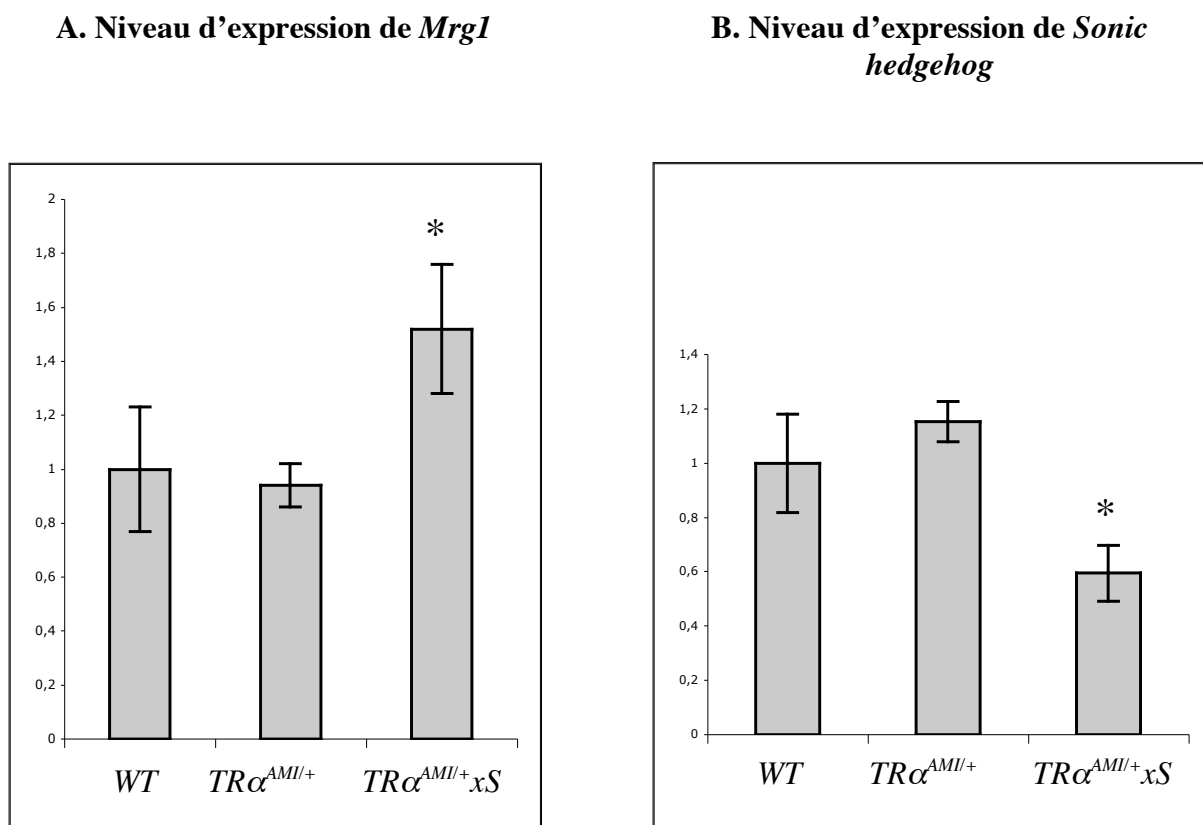


Figure 19 : Altération de l'expression de nouveaux gènes-cibles dans le cervelet des souris $TR\alpha^{AMI/+}xS$ à P15

Des expériences de PCR quantitative ont été réalisées à partir de 3 cervelets sauvages, 3 cervelets contrôles $TR\alpha^{AMI/+}$ et 3 cervelets $TR\alpha^{AMI/+}xS$ à P15, selon le protocole décrit dans l'article 4. L'expression de *Mrg1* est activée (A) tandis que l'expression de *Sonic Hedgehog* est réprimée (B) chez les souris $TR\alpha^{AMI/+}xS$ (* $p < 0,05$).

(Weinstein et al., 1990) et favorise la néoglucogénèse (Muller and Seitz, 1980). De nombreuses voies métaboliques hépatiques sont régulées par T3 : la glucogénèse (Bartels and Sestoft, 1980), l'utilisation du glucose (Ness and Pendleton, 1991 ; Itoh et al., 2001), le transport du glucose et la signalisation de l'insuline (Weinstein et al., 1994 ; Romero et al., 2000 ; Torrance et al., 1997 ; Zhang et al., 2003).

L'hypothyroïdie est associée à un phénotype de résistance à l'insuline (Dubaniewicz et al., 1989 ; Rochon et al., 2003). Alors que les souris $TR\alpha^{0/0}$ ont effectivement une clairance ralentie du glucose (Jun Mori, données non publiées), les souris $TR\alpha^{R384C/+}$ ont au contraire une clairance accélérée (Vennstrom, Stockholm, congrès Nuclear Receptor Hormone, Septembre 2006). De façon inexplicée, l'expression d'un $TR\alpha 1$ muté induit donc un phénotype opposé à la délétion du récepteur. Il est cependant difficile de comprendre quels sont les mécanismes impliqués en utilisant des mutants constitutifs. Le système conditionnel $TR\alpha^{AM/}$ permet d'étudier les causes de ce phénotype paradoxal, en identifiant dans un premier temps le tissu dont le fonctionnement diffère entre les deux mutants.

2. Matériel et méthode

Le test de tolérance au glucose consiste à injecter à des souris à jeun depuis 12h une solution de 3mg de D-glucose/g, par voie intrapéritonéale. La glycémie est ensuite mesurée toutes les 15 minutes pendant 2 heures à partir d'une goutte de sang, avec un appareil de mesure de la glycémie destiné aux patients diabétiques (Accu-Chek Active, Roche diagnostique, Référence 03533727). Les expériences sont réalisées sur au moins 7 mâles âgés de 8 à 12 semaines pour chaque condition et répétées deux fois de façon indépendante car les variations individuelles sont élevées.

Les mutants sont hétérozygotes pour l'allèle $TR\alpha^{AM/}$ et possèdent le transgène codant pour la CRE. Les souris contrôles sont des souris du même fond génétique, $TR\alpha^{AM/+}$ et ne possédant pas le transgène codant pour la CRE. Les souris $TR\alpha^{AM/+} \times CagCreERTM$, $TR\alpha^{AM/+} \times Ap2CreERT2$ et les souris contrôles $TR\alpha^{AM/+}$ ont reçu 5 injections quotidiennes de 1mg/20g de tamoxifène (Sigma T-5648), le test de tolérance au glucose a été réalisé 7 jours plus tard.

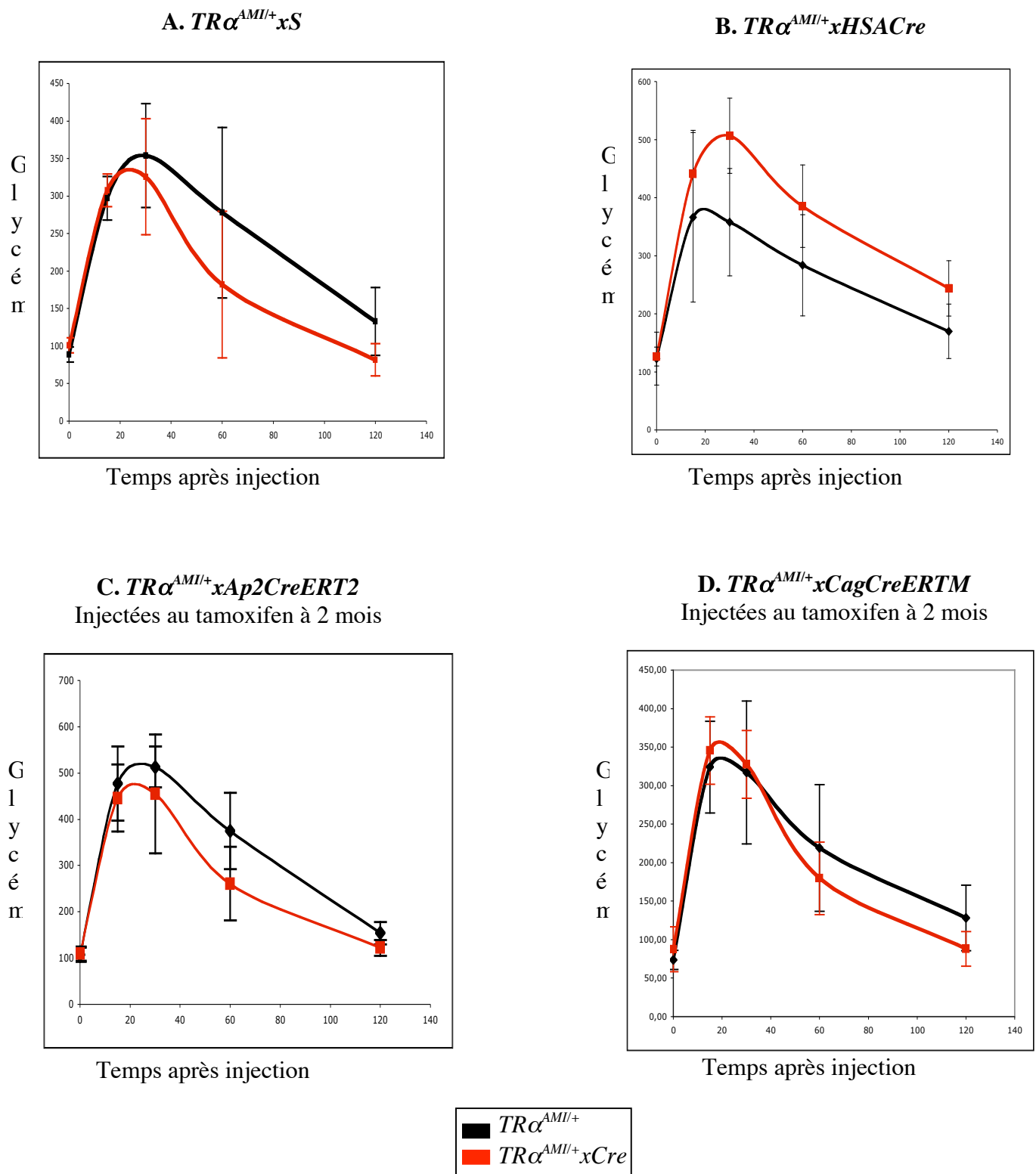


Figure 20 : Tests de tolérance au glucose chez les mutants $TR\alpha^{AMI}$

Une solution de glucose a été injectée à des souris à jeun depuis 12h. La glycémie a été mesurée chez des souris exprimant le récepteur $TR\alpha^{1L400R}$ de façon constitutive (A), uniquement dans le muscle (B), uniquement dans le tissu adipeux à l'âge adulte (C) ou de façon ubiquitaire à l'âge adulte (D).

3. Résultats

3.1. L'analyse des mutants tissu-spécifique permet d'exclure la responsabilité du muscle

Le test de tolérance au glucose permet de tester la capacité des souris à gérer l'excès de glucose dans le sang. Dans un premier temps, nous avons réalisé un test de tolérance au glucose chez les souris $TR\alpha^{AMI/+}xS$, qui expriment le récepteur TR α 1L400R de façon constitutive. Comme les souris $TR\alpha1^{R384C/+}$, elles présentent une clairance accélérée du glucose (figure 20 A).

Dans ces expériences, le glucose entre principalement dans le muscle. Afin de tester son implication dans le phénotype, des souris exprimant le récepteur TR α 1L400R seulement dans le muscle ont été générées, en utilisant la lignée *HSACre* (Miniou et al., 1999). Les souris $TR\alpha^{AMI/+}xHSACre$ clearent le glucose moins rapidement que les souris contrôles (figure 20 B). Elles présentent donc un phénotype hypothyroïdien classique. Le muscle n'est donc pas responsable du phénotype paradoxal des souris $TR\alpha^{AMI/+}xS$.

Des souris exprimant TR α 1L400R seulement dans les adipocytes ont également été générées, en utilisant la lignée *Ap2CreERT2* (Imai et al., 2001). Leur clairance du glucose semble accélérée par rapport aux contrôles, mais la différence n'est pas significative (figure 20 C). Ce problème est fréquent lorsqu'une recombinaise CRE inducible est utilisée, car l'efficacité de recombinaison est toujours partielle, ce qui ne permet pas de conclure fermement.

Afin de déterminer si le phénotype est développemental ou non, l'expression ubiquitaire de la mutation a été induite seulement à l'âge adulte, en utilisant la lignée *CagCreERTM* (Hayashi and McMahon, 2002). L'efficacité de la CRE a été évaluée par PCR à 70%, notamment dans le tissu adipeux brun. Un test de tolérance au glucose ne met pas en évidence de phénotype net chez les souris $TR\alpha^{AMI/+}xCagCreERTM$, ce qui suggère que la clairance accélérée du glucose résulte d'une anomalie développementale (figure 20 D).

3.2. Le métabolisme des souris $TR\alpha^{AMI/+}xS$ est normalisé à la température de neutralité thermique

Température ambiante	Période	Génotype	VO2		VCO2		QR		TEE	
			Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
23°C	24 heures	WT	21,15	0,78	21,81	1,91	1,03	0,05	154,89	7,69
		<i>TR^{AMI/+}xS</i>	20,09	4,94	17,53	5,05	0,83*	0,07	140,22	35,33
	Jour	WT	19,94	1,08	20,40	2,06	1,03	0,06	145,71	9,39
		<i>TR^{AMI/+}xS</i>	18,11	4,57	14,69	4,45	0,77*	0,05	124,13	31,62
	Nuit	WT	22,37	1,08	23,22	2,10	1,04	0,05	164,06	9,54
		<i>TR^{AMI/+}xS</i>	22,13	5,45	20,42	6,05	0,89*	0,09	156,68	40,22
30°C	24 heures	WT	18,43	2,91	16,25	2,63	0,87	0,02	130,06	20,60
		<i>TR^{AMI/+}xS</i>	14,12	3,15	14,02	3,74	0,99	0,11	102,45	23,67
	Jour	WT	17,11	2,30	14,46	1,91	0,84	0,02	119,62	15,99
		<i>TR^{AMI/+}xS</i>	12,39*	2,68	12,16	3,70	0,99	0,15	89,65	20,91
	Nuit	WT	19,75	3,57	18,04	3,39	0,91	0,03	140,50	25,59
		<i>TR^{AMI/+}xS</i>	15,85	4,14	15,88	4,46	0,99	0,08	115,25	30,52

Figure 21 : Analyse des gaz respirés par les souris *TR^{AMI/+}xS*

La plateforme ANIPHY a analysé les échanges respiratoires pour 6 mâles *TR^{AMI/+}xS* et 4 mâles sauvages de la même portée, à l'âge de 3 mois. Le volume d'oxygène absorbé (VO2) et le volume de CO2 rejeté (VCO2) permettent de calculer le quotient respiratoire (QR) et la dépense énergétique totale (TEE).

$$QR = VCO2 / VO2$$

$$TEE \text{ (kJ/jour)} = 16,17 \text{ VO2 (L/jour)} + 5,03 \text{ VCO2 (L/jour)} + 5,98 \text{ N (g/jour)}$$

N est l'azote excrété, il est évalué à 0,1 g/jour.

Quand la température ambiante est de 23°C, le quotient respiratoire des *TR^{AMI/+}xS* est significativement réduit. Les souris ont donc un métabolisme basculé vers l'utilisation des lipides plutôt que des glucides. Quand elles sont placées à 30°C, température de neutralité thermique pour les souris, cette différence disparaît.

L'analyse des gaz respirés permet d'évaluer l'importance du métabolisme glucidique par rapport au métabolisme lipidique. En effet, le quotient respiratoire QR (volume de CO₂ expiré / volume d'O₂ inspiré) est différent selon la nature du combustible□

- combustion du glucose: $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O + \text{chaleur}$, QR=1

- combustion de l'acide palmitique : $CH_3(CH_2)_{14}COOH + 23 O_2 \rightarrow 16 H_2O + 16 CO_2 + \text{chaleur}$, QR= 16/23 = 0,7

Quand le glucose est la source énergétique majoritaire, le QR est proche de 1. Quand les lipides sont la source énergétique majoritaire, le QR est proche de 0,7.

Des bilans métaboliques ont donc été réalisés sur les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$ à une température ambiante de 23°C et 30°C par Peggy del Carmine à la plateforme ANIPHY de Lyon, sous la direction de Michel Beylot. A 23°C, les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$ ont un QR significativement diminué par rapport aux contrôles□ elles utilisent davantage les lipides comme source d'énergie. A 30°C cette différence n'est plus significative (figure 21), elles ont retrouvé une utilisation des substrats énergétiques comparable aux souris sauvages.

4. Discussion

Comme les souris $TR\alpha^{R384C/+}$, les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$ ont une clairance accélérée du glucose. Les souris qui expriment le récepteur TR α 1L400R uniquement dans le muscle présentent au contraire une clairance du glucose ralentie, comparable à celle observée chez les souris hypothyroïdiennes ou $TR\alpha^{0/0}$. Le muscle ne semble donc pas impliqué dans le phénotype paradoxal des souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$. L'implication du tissu adipeux reste à démontrer.

Le bilan métabolique a montré qu'à température ambiante (23°C) ces souris utilisent essentiellement des lipides comme source énergétique. Leur quantité de réserves glucidiques ou leur mobilisation pourraient être réduites, ce qui expliquerait que les souris métabolisent plus rapidement le glucose nouvellement apporté. A 30°C, température de neutralité thermique pour la souris, ce phénotype a disparu, ce qui suggère qu'il résulte d'une anomalie de la thermogenèse à 23°C. En effet, à 23°C, 7°C en dessous la température de neutralité thermique de la souris, la thermogenèse obligatoire et la thermogenèse facultative sont toutes deux requises pour maintenir la température corporelle et elles requièrent de l'énergie. Un dysfonctionnement d'un mécanisme de thermogenèse pourrait conduire à épuiser les réserves

glucidiques, ce qui expliquerait que les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$ aient une clairance accélérée du glucose. Pour le vérifier, il faudrait observer si les courbes de glycémie de ces souris se normalisent à 30°C.

Une réduction de la température corporelle et / ou une incapacité à maintenir la température corporelle ont été rapportées de façon consistante pour les souris invalidées ou mutantes pour $TR\alpha 1$. (Flamant and Samarut, 2003 □ Marrif et al., 2005 □ article 4), tandis que la délétion conjointe de *THRB* aggrave ce phénotype (Gauthier et al., 2001 □ Golozoubova et al., 2004). Si une anomalie d'un des mécanismes de la thermogénèse explique le phénotype métabolique des souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$, alors cette anomalie doit être absente chez les souris $TR\alpha^{0/0}$. A 23°C, les souris $TR\alpha^{0/0}$ ont une température corporelle diminuée en raison d'un réglage plus bas que la norme du thermostat hypothalamique, mais elles ne présentent pas de signe évident de stress thermique. Bien qu'il existe un défaut de thermogénèse induite par la noradrénaline dans le tissu adipeux brun, la thermogénèse obligatoire est maintenue. Une thermogénèse musculaire moins efficace et plus dépensière en énergie que celle du tissu adipeux brun compenserait son dysfonctionnement (Marrif et al., 2005). Un défaut de la thermogénèse musculaire n'est probablement pas responsable de la clairance accélérée du glucose chez les souris $TR\alpha^{AM/+/xS}$ car les souris $TR\alpha^{AM/+/xHSACre}$ ne présentent pas ce phénotype. Pour tester l'implication du tissu adipeux brun, il faudrait réaliser des tests de tolérance au glucose sur des souris exprimant $TR\alpha 1L400R$ uniquement dans ce tissu. Notons que l'*Ap2CreERT2* n'est pas très intéressante car l'activité de la CRE y est faible (Karine Gauthier, communication personnelle).

A l'échelle moléculaire, le mécanisme pourrait impliquer la protéine découplante UCP1. En effet, UCP1 est présente dans la membrane interne de la mitochondrie, elle augmente la conductance des protons, ce qui provoque un découplage de l'oxydation mitochondriale, à la base du cycle futile utilisé pour produire de la chaleur. Le promoteur d'*UCP1* contient des éléments de réponse à l'AMP cyclique, qui le placent sous contrôle prédominant des récepteurs adrénergiques. Deux *TRE* ont également été identifiés, dont l'un est nécessaire à la potentialisation des effets de l'AMP cyclique par T3 (Silva and Rabelo, 1997). A 23°C, l'expression d'*UCP1* n'est diminuée ni chez les souris $TR\alpha^{0/0}$ (Marrif et al., 2005) ni chez les souris $TR\alpha 1^{-/-} TR\beta^{-/-}$ (Golozoubova et al., 2004). Les TR n'activent donc pas l'expression d'*UCP1* à 23°C, mais l'aporécepteur $TR\alpha 1L400R$ pourrait réprimer son

expression basale. Il serait intéressant de quantifier son expression dans le tissu adipeux brun des souris $TR\alpha^{AMI/+}xS$.

Quel que soit le mécanisme impliqué, un ou plusieurs organes des souris $TR\alpha^{AMI/+}xS$ présentent un phénotype différent de celui observé chez les souris $TR\alpha^{0/0}$. Pour le ou les identifier, les mutants exprimant spécifiquement TR α 1L400R dans un tissu sont particulièrement intéressants. Cet exemple illustre l'intérêt du système conditionnel $TR\alpha^{AMI}$ pour comprendre un phénotype complexe.

DISCUSSION – PERSPECTIVES

I. L'aporécepteur $TR\alpha 1$: effets pathologiques et physiologiques

A. Prédominance des actions génomiques de $TR\alpha 1$ dans la pathogénie de l'hypothyroïdie

Les souris $TR\alpha^{AMH/+}xS$, qui expriment un récepteur muté $TR\alpha 1L400R$ de façon constitutive, présentent un phénotype très proche de celui observé chez les souris hypothyroïdiennes, par exemple les souris $Pax8^{-/-}$. L'analyse phénotypique de ces souris clarifie le rôle de l'aporécepteur $TR\alpha 1$. En effet, les deux précédentes lignées présentant une mutation ponctuelle dans le domaine de fixation du ligand de $TR\alpha 1$ ont des phénotypes divergents : la mutation R384C entraîne un retard de développement post-natal sévère (Tinnikov et al., 2002), tandis que la mutation P398H est responsable d'obésité chez l'adulte (Liu et al., 2003). La grande similitude phénotypique entre les souris $TR\alpha^{AMH/+}xS$ et $TR\alpha^{R384C/+}$ rend les conclusions de l'étude du troisième knock-in $TR\alpha^{P398H/+}$ difficiles à généraliser.

A travers deux exemples, nous montrerons comment le phénotype des souris $TR\alpha^{AMH/+}xS$ et $TR\alpha^{R384C/+}$ marginalise les effets non génomiques de l'hormone thyroïdienne.

L'expression de l'hormone de croissance GH, très faible chez les rats hypothyroïdiens, est fortement activée par des doses subphysiologiques de T4 en 20 à 30 minutes (Volpato and Nunes, 2001). Chez le rat thyroïdectomisé, GH est détectée majoritairement à la périphérie des cellules somatotropes. Parallèlement, la quantité d'ACTINE F est réduite et le cytosquelette d'actine désorganisé. 30 minutes après l'administration de T3, GH est principalement détectée dans la région périnucléaire, suggérant que sa synthèse et sa sécrétion sont accrues. Ces effets sont corrélés à la restauration d'un niveau d'ACTINE F normal et à la réorganisation du cytosquelette. Il a donc été proposé que T3 active la sécrétion de GH en agissant directement sur le cytosquelette d'actine (Goulart da Silva et al., 2006). Il a été également proposé que le défaut de migration des cellules granulaires externes observé dans le cervelet hypothyroïdien soit dû à la perte de l'action non génomique exercée par T4 sur la polymérisation de l'ACTINE F durant l'allongement des neurites (Farwell et al., 2005).

Farwell et al., 2006). Or une réduction importante de l'expression de GH et la persistance de la couche granulaire externe à P21 sont observées chez les souris *TRα^{R384C/+}* (Tinnikov et al., 2002) Venero et al., 2005) et *TRα^{AMH/+}xS* (article 4) ce qui prouve que TR est impliqué dans les deux cas.

La mutation R384C de TRα1 réduit de 10 fois l'affinité du récepteur pour T3. Elle ne permet pas d'exclure que certains phénotypes des souris *TRα^{R384C/+}* résultent de la suppression d'effets non génomiques médiés par TRα1 / T3 indépendamment des coactivateurs, comparables à ceux médiés par TRβ1 / T3 sur la voie de la PI3K (Storey et al., 2006). Comme les souris *TRα^{AMH/+}xS* portent une mutation ponctuelle de TRα1 qui abolit spécifiquement les interactions avec les coactivateurs, elles apportent la preuve que l'activité transcriptionnelle de TR est requise pour induire l'expression de la GH, la migration des cellules granulaires externes et plus généralement pour médier un grand nombre des fonctions développementales de T3. Comme la majorité des anomalies observées lors d'hypothyroïdie congénitale sont présentes chez les souris *TRα^{AMH/+}xS*, ceci ne laisse qu'une place marginale aux actions non génomiques. Ces effets non génomiques pourraient être de simples réminiscences des fonctions ancestrales de la T3, indépendantes des TR (cf. introduction I. C.).

La pathogénie de l'hypothyroïdie congénitale résulte donc principalement de l'action négative exercée par TRα1 en absence de son ligand (article 4).

B. Rôle de TRα dans la transition périnatale

La fréquence cardiaque, réduite chez l'embryon de souris, augmente fortement à la naissance, passant de 100 à 400 battements par minute entre E9,5 et P21. Les souris *TRα^{0/0}* souffrent de tachycardie pendant le développement embryonnaire tandis qu'à l'âge adulte, elles souffrent de bradycardie. TRα potentialise donc la modification de la fréquence cardiaque entre la vie fœtale et la vie l'adulte, il peut être considéré comme un inducteur direct de la transition cardiaque périnatale. TR est également impliqué dans d'autres transitions périnatales, notamment l'implantation à la naissance de l'érythropoïèse transitoire dans la rate (Angelin-Duclos et al., 2005) et la maturation post-natale de l'intestin (Plateroti et al., 2001) Plateroti et al., 2006).

Comme l'aporrécepteur TR α bloque la maturation de différents tissus durant les deux premières semaines de vie post-natale, le développement de ces tissus pourrait également être régulé par la transformation de l'aporrécepteur TR α en holorrécepteur. Afin de généraliser ou non ce modèle, l'analyse du phénotype des souris mutantes pour la fonction activatrice de TR α à P15 devrait être complétée avec l'analyse du phénotype embryonnaire de souris mutantes pour la fonction répressive de TR α . Il faudrait par exemple comparer la fréquence cardiaque, le phénotype osseux ou cérébral des mutants TR $\alpha^{AM/+}xS$ (absence de transactivation) et TR $\alpha^{0/0}$ (absence de transactivation et de transrepression).

D'un point de vue théorique, les voies de signalisation impliquées dans la différenciation cellulaire et plus généralement dans le développement *via* une régulation transcriptionnelle doivent réprimer l'expression de leurs gènes-cibles en absence de ligand pour pouvoir faire basculer le devenir d'une cellule (Barolo and Posakony, 2002). Il peut ainsi exister un effet de seuil : l'expression des gènes-cibles bascule d'un niveau très faible à un niveau élevé. Concernant la signalisation de T3, cette bascule repose chez le Xénope sur une amplification de la réponse à T3 dès que l'hormone est présente, par auto-induction de l'expression de *THRB* (Buchholz et al., 2005). Chez les mammifères, ce n'est pas le cas. La répression initiale des gènes-cibles expliquerait que la signalisation de l'hormone thyroïdienne ait une efficacité suffisante pour faire partie des grandes voies du développement.

C. Rôles physiologiques de l'aporrécepteur TR pendant le développement embryonnaire

L'article 2 est la première mise en évidence d'une action physiologique de l'aporrécepteur TR α pendant le développement embryonnaire de la souris. Dans le cerveau foetal, le système FindT3 montre que l'activité de T3 débute à E15,5. Avant cette date, si TR α est présent dans le cerveau, il a probablement un rôle aporrécepteur. Jusqu'à présent, son expression n'a pas été détectée avant E13,5 - E15,5 (Forrest et al., 1991 ; Morreale de Escobar et al., 1985), mais une étude systématique par hybridation *in situ* suggère qu'il est exprimé à partir de E9,5 (Gray et al., 2004) aussi il serait intéressant de le vérifier par RT-PCR quantitative.

Les TR ne sont donc pas uniquement des effecteurs de la réponse à T3. Bien que le Xénope soit l'exemple de référence montrant comment T3 déclenche et amplifie l'activité des TR au cours de la métamorphose, un rôle physiologique des TR non liés à T3 a récemment été identifié chez cette espèce. L'expression par transgénèse germinale d'un récepteur TR β muté, TRI188K, induit une létalité précoce et des défauts cranio-faciaux, en particulier un développement anormal de l'œil, la rétine étant souvent désorganisée (Havis et al., 2006). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine montrent que TRI188K a perdu ses capacités répressives, il n'est plus capable de recruter NCOR sur des gènes-cibles de T3. L'administration à des embryons sauvages de NH3, un agoniste et antagoniste de T3 qui induit la dissociation des corépresseurs, reproduit le phénotype oculaire. L'activité répressive de TR semble donc requise pour le développement normal de l'œil. Cette structure serait physiologiquement protégée de T3 par la forte expression de la *D3* (Morvan Dubois et al., 2006). En effet, l'administration d'un inhibiteur des déiodases entraîne une microphthalmie, potentialisée par la T3 exogène (Havis et al., 2006). Il faudrait observer si la répression des gènes-cibles endogènes est alors levée, ce qui prouverait que l'aporrécepteur TR a un rôle physiologique sur le développement embryonnaire de l'œil de Xénope.

TR α 1 pourrait également avoir un rôle répresseur physiologique au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre (Essner et al., 1997a). Cette fonction répressive de TR pourrait donc être ancienne, d'un point de vue évolutif. Il serait particulièrement intéressant de tester si TR avait une action répressive avant de rencontrer T3 au cours de l'évolution. La rencontre T3 –TR serait alors un événement majeur au cours du développement et de l'évolution. Elle expliquerait peut-être certaines similarités dans les remodelages tissulaires observées lors de la sortie des eaux et lors de la transition néonatale chez les mammifères.

II. Action neurodéveloppementale de T3

A. Expliquer l'hétérogénéité de la signalisation de T3

Les souris transgéniques *FindT3*, qui possèdent un transgène rapporteur pour l'activité de T3, ont montré que la signalisation de l'hormone thyroïdienne est extrêmement hétérogène dans le cerveau au cours du développement post-natal. Le patron d'activité de T3 est fortement corrélé à la distribution de l'hormone. Nous avons observé que la D2 n'est pas requise pour générer ce patron d'activité hétérogène. Arturo Hernandez a montré que la D3 limite l'action de T3 dans certaines structures du cerveau (Arturo Hernandez, abstract for ATA meeting, 2006), même s'il est clair que d'autres mécanismes sont impliqués. Le catabolisme de l'hormone semble donc plus important que l'anabolisme pour réguler la concentration locale de T3. Chez le Xénope, la dégradation de la T3 par la D3 est nécessaire au développement normal de l'œil (Havis et al., 2006). La D3 inactive aussi une grande partie de la T3 dans le placenta des mammifères (Chan and Kilby, 2000). Ceci suggère que la dégradation de T3 est un mécanisme important pour restreindre son activité à certains tissus ou à certaines cellules.

B. Modèle de cascades moléculaires induites par T3 dans le cervelet post-natal

a. Le nombre faible de gènes-cibles directs de T3 suggère des activations en cascade

Dans le génome, il existe un grand nombre de séquences consensus sur lesquelles TR peut se fixer, mais très peu de ces *TRE* potentiels sont fonctionnels dans le cervelet post-natal, c'est-à-dire corrélés à une régulation transcriptionnelle du gène par T3. Ces gènes sont potentiellement des cibles de T3 dans d'autres organes, ou à une autre période. Le nombre restreint de gènes-cibles directs dans le cervelet suggère que l'action de T3 est relayée par des mécanismes indirects de cascades d'activation. En raison du faible nombre d'études visant à déterminer les gènes-cibles directs de T3 dans les autres organes (Yen et al., 2003□Flores-Morales et al., 2002□Moeller et al., 2005b□Le Bouter et al., 2003□Miller et al., 2004), il est difficile de savoir si globalement TR agit sur un très petit nombre de gènes-cibles directs qui induisent secondairement des cascades, ou si TR régule directement l'expression d'un grand nombre de gènes-cibles.

L'identification des gènes dérégulés par l'hypothyroïdie est la première étape pour disséquer la cascade induite par T3 dans le cervelet. Les différents acteurs doivent ensuite être

hiérarchisés, c'est pourquoi nous ne pouvons proposer à l'heure actuelle que des mécanismes d'actions spéculatifs.

b. Action neurodéveloppementale des gènes-cibles directs de T3

Les gènes-cibles directs de T3 que nous avons identifié, *Akap1*, *Hbb-a*, *Hairless*, *Mrg1*, *Tgm1* et *Cdh1*, ne sont pas des acteurs majeurs du neurodéveloppement, il est difficile de les considérer comme responsables du phénotype cérébelleux hypothyroïdien. *Mrg1* pourrait constituer une exception, aussi nous lui prêterons une attention particulière.

Mrg1/Meis2 code pour une protéine à homéobox MEIS qui régule directement l'expression du récepteur d'éphrine *EphA8* (Shim et al., 2007). En effet, une analyse du promoteur de *EphA8* a révélé une séquence CGGTCA critique pour son activité enhancer. Un test simple hybride a montré qu'une protéine à homeobox MEIS pouvait se fixer sur ce motif. A proximité du motif CGGTCA ont été identifiés des sites de liaison pour PBX, un facteur de transcription à homéobox TALE connu pour interagir avec les facteurs de transcription à homeobox MEIS. Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine montre que MRG1 et PBX2 sont constitutivement liés aux séquences régulatrices de *EphA8* dans le mésencéphale dorsal à E11,5. Cependant, *in vitro*, MRG1 et PBX2 activent la transcription de *EphA8* seulement en présence d'un inhibiteur des histones déacétylases, ce qui suggère l'intervention *in vivo* d'un cofacteur non identifié (Shim et al., 2007).

Puisque *Mrg1* est surexprimé dans les cervelets hypothyroïdiens et $TR\alpha^{AMT}xS$ à P15, *EphA8* pourrait être surexprimé aussi. Si cette hypothèse est confirmée, la surexpression de *EphA8* pourrait expliquer les problèmes de migration cellulaire et de synaptogénèse observés dans les cerveaux hypothyroïdiens. En effet, la famille des récepteurs des éphrines et de leurs ligands joue un rôle important dans le guidage des axones, la migration cellulaire, l'organisation des limites cellulaires et la synaptogénèse (Poliakov et al., 2004). *EphA8* est exprimé selon un gradient rostro-caudal dans les colliculus supérieurs. Ce gradient peut contribuer au développement des projections de la rétine sur les colliculus (Koo et al., 2003). Or la projection ipsi-latérale des axones est régulée par T3 au cours de la métamorphose du Xénope (Marsh-Armstrong et al., 1999a). Une cascade T3 - MRG1 - EPHA8 pourrait donc expliquer un certain nombre des actions neuronales de T3.

c. Activation indirecte de cascades impliquées dans le neurodéveloppement

Si elle n'agit pas directement sur leur expression, T3 régule indirectement l'expression de facteurs neurotrophiques ou de facteurs informatifs pour le neuro-développement, dont la dérégulation peut expliquer le phénotype cérébelleux hypothyroïdien. L'expression de *BDNF* et de la *neurotrophine 3 (NT-3)* est diminuée dans le cervelet des rats hypothyroïdiens (Koibuchi et al., 2001). La délétion de *NT-3* uniquement dans le système nerveux entraîne un développement anormal du cervelet et une augmentation de l'apoptose des cellules granulaires à P8, en absence d'anomalies visibles des cellules de Purkinje (Bates et al., 1999). L'ablation génétique de *BDNF* induit une augmentation de l'apoptose des cellules granulaires externes et une réduction de l'arborisation des cellules de Purkinje (Schwartz et al., 1997). *BDNF* et *NT-3* pourraient médier de nombreuses actions de T3, car la restauration de leur expression prévient en partie les anomalies cérébelleuses induites par l'hypothyroïdie (Neveu and Arenas, 1996). L'expression du facteur de croissance IGF1 est également réprimée dans le cervelet hypothyroïdien à P7 (Elder et al., 2000). Or sa surexpression dans le cervelet induit une augmentation la prolifération des cellules granulaires et une réduction de leur apoptose (Ye et al., 1996□Chrysis et al., 2001). Cependant, comme ces gènes ne sont pas directement régulés par T3, il est difficile d'exclure que leur expression soit diminuée seulement en raison d'un retard de développement du cervelet lors d'hypothyroïdie.

De même, *SHH* n'est probablement pas un gène-cible direct de T3, puisqu'il n'existe pas de séquence consensus de *TRE (DR4, ER6 ou IR0)* dans son promoteur. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine à grande échelle permettraient de vérifier que TR ne se fixe pas dans les 40 kb entourant le site d'initiation de la transcription. De façon indirecte, *MRG1* pourrait réprimer l'expression de *SHH*, comme cela a été observé dans le bourgeon de membre de poulet (Capdevila et al., 1999). Un mécanisme plus vraisemblable impliquerait le récepteur orphelin *RORα*. En effet, l'expression de *RORα* est réduite dans le cervelet hypothyroïdien à P15 (Koibuchi et al., 2001). Or ce récepteur régule directement l'expression de *SHH* en se fixant sur deux éléments de réponse *RORE* présents dans le promoteur (Gold et al., 2003). Un autre mécanisme pourrait reposer sur la fixation de *TRα1L400R* sur ces *RORE*, sur lesquels *TRβ* ne se lie normalement pas (Gold et al., 2003). Une expérience

d'immunoprécipitation de la chromatine anti-TR sur des cerveaux embryonnaires $TR\alpha^{AM/+}xS$ le mettrait en évidence.

Afin de déterminer le rôle de SHH dans le phénotype cérébelleux hypothyroïdien, il serait intéressant de réaliser des cultures de tranches de cervelet $TR\alpha^{AM/+}xS$ à P15 et de les exposer à du SHH recombinant, afin d'observer si la migration des cellules granulaires externe est restaurée. Si un effet significatif était observé, une approche génétique pourrait être envisagée. SHH pourrait être surexprimé par transgénèse dans le cervelet des souris $TR\alpha^{AM/+}xS$, par exemple en utilisant le promoteur *Pcp2* pour restreindre son expression aux cellules de Purkinje, où il s'exprime physiologiquement (Wechsler-Reya and Scott, 1999 □ Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999). Le phénotype cérébelleux serait peut-être partiellement ou totalement corrigé.

C. Origine de la persistance anormale de la couche granulaire externe

Lors d'hypothyroïdie, la persistance anormale de la CGE à P21 est difficile à expliquer car tous les types de cellules nerveuses sont sensibles à l'hormone thyroïdienne *in vitro* (cf. introduction II. A. b). La lignée de souris *FindT3B* a montré que T3 est active sur un nombre restreint de neurones dans le cervelet post-natal □ certaines cellules granulaires externes et les cellules de Purkinje.

a. TR n'a pas un effet cellule autonome sur les cellules granulaires externes

Le système $TR\alpha^{AM}$ permet d'identifier quelles sont les cellules responsables du retard de migration des cellules granulaires externes, par suppression conditionnelle de la réponse à T3 dans un type cellulaire donné. L'expression constitutive et ubiquitaire de $TR\alpha^{1L400R}$ reproduit la persistance anormale de la CGE à P21 (article 4). Son expression dans les cellules granulaires externes ne la reproduit pas : Nicolas Fossat a croisé la lignée $TR\alpha^{AM}$ avec la lignée *Otx2CreERT2* (Fossat et al., 2006) et réalisé des injections de tamoxifène à P2 pour déclencher l'activité de la recombinaison CRE. Sur des coupes de cervelet à P21, bien que l'expression de $TR\alpha^{1L400R}$ ait été déclenchée dans les cellules granulaires externes des lobules postérieurs, la CGE ne persiste pas dans ces lobules (données non publiées). *In vivo*, $TR\alpha^1$ ne semble donc pas avoir un effet autonome sur ces cellules.

b. Les cellules de Purkinje pourraient être impliquées

Dans le cervelet, IGF1 et SHH sont uniquement sécrétés par les cellules de Purkinje (Bondy and Lee, 1993 □ Wechsler-Reya and Scott, 1999 □ Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999). Il a été proposé que SHH régule à distance la prolifération des cellules granulaires externes qui expriment Gli1, un des facteurs de transcription médiant sa signalisation (Stecca and Ruiz i Altaba, 2005). Les cellules de Purkinje pourraient donc être le type cellulaire initialement affecté par l'hypothyroïdie. Le défaut de sécrétion de SHH (figure 21) ainsi que de facteurs neurotrophiques comme IGF1 (Elder et al., 2000) et de BDNF (Neveu and Arenas, 1996) affecterait secondairement la prolifération et donc la migration des cellules granulaires externes.

D'un autre côté, *Kirrel3/NEPH2* est un gène-cible de T3 qui n'est pas exprimé dans les cellules de Purkinje pendant la période post-natale, mais dans la couche moléculaire (Tamura et al., 2005). Or cette couche supporte la migration des cellules granulaires externes. La répression de *Kirrel3* pourrait être responsable du retard de migration des cellules granulaires externes, car ce gène code pour une protéine homologue de la NEPHRINE sur le plan structural, ce qui suggère qu'il s'agit d'une molécule d'adhésion cellulaire. *Kirrel3* étant exprimé dans les arbres dendritiques, un rôle dans la formation des synapses a également été proposé (Gerke et al., 2006). Des souris knock-out pour ce gène ne sont pas encore disponibles, mais il serait intéressant de regarder si elles présentent un phénotype cérébelleux.

Pour déterminer si l'action de $TR\alpha 1$ sur la différenciation précoce des cellules de Purkinje (cf. introduction II. A. B. 2) est responsable ou non du retard de migration des cellules granulaires externe, il faudrait croiser la lignée $TR\alpha^{AM}$ avec une lignée exprimant la CRE uniquement dans ces cellules (Woodruff-Pak et al., 2006). La lignée *Cre3*, déjà présente dans le laboratoire, est également utilisable car la recombinaison CRE est exprimée seulement dans les neurones post-mitotiques (Banares et al., 2005). Or, en dehors des neurones de la couche granulaire interne, les cellules de Purkinje sont les seuls neurones post-mitotiques du cervelet post-natal.

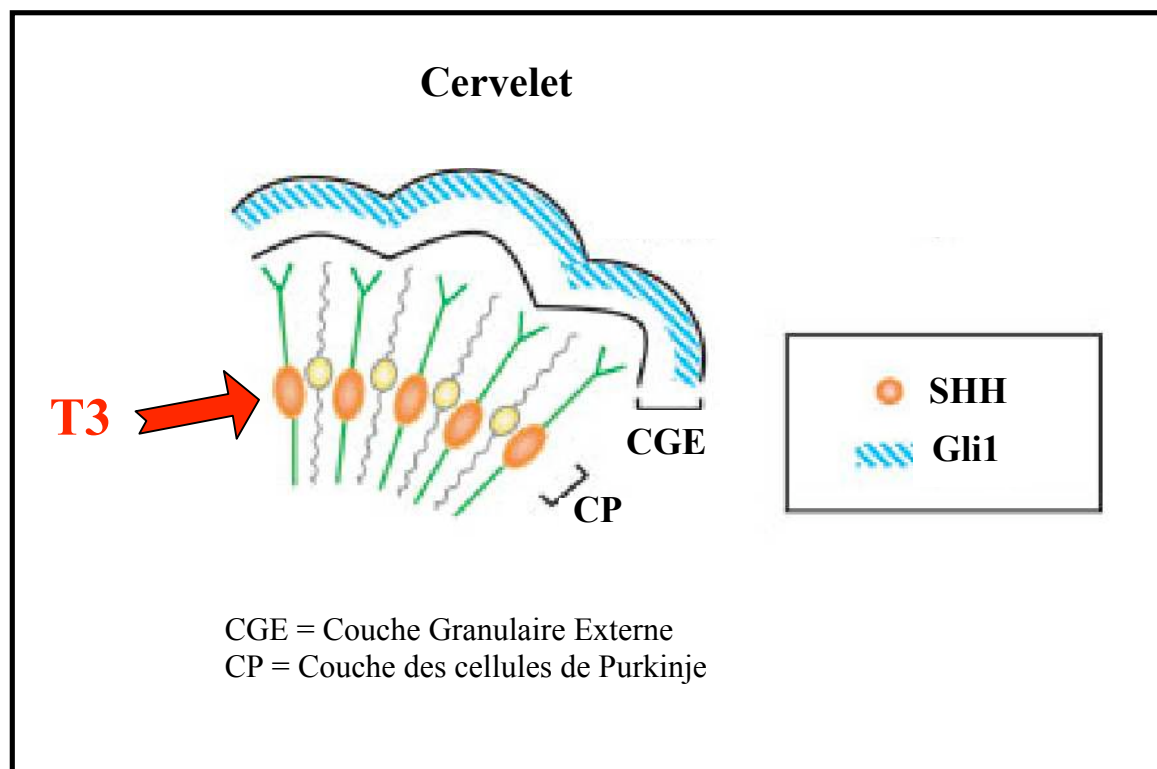


Figure 22 : Modèle d'action indirecte de T3 sur la couche granulaire externe

Dans le cervelet, dès E17, T3 active la sécrétion de Sonic hedgehog (SHH) par les cellules de Purkinje. SHH agit alors sur la prolifération des cellules granulaires externes en activant le facteur de transcription Gli1 (Stecca et al., 2005).

D. L'aporrécepteur TR α 1 induit une dérégulation du transcriptome dans le cerveau embryonnaire

Chez le rat et la souris, la thyroïde fœtale est fonctionnelle à partir de 18,5 jours de vie embryonnaire (E18,5). Or T4 et T3 sont détectables dans l'embryon de rat dès E13,5-E14,5 (Obregon et al., 1984). T4 peut donc franchir la barrière placentaire, même si une grande quantité est dégradée dans le placenta (Chan and Kilby, 2000). La T3 présente chez l'embryon est soit de la T3 maternelle, soit elle résulte de la conversion de la T4 maternelle en T3 par l'embryon. Une hypothyroïdie maternelle entraîne une réduction de la viabilité des embryons, une diminution de leurs poids, un retard de maturation osseuse et cardio-respiratoire et elle compromet le développement neural néonatal (Chan and Kilby, 2000). Une hypothyroxinémie maternelle, c'est-à-dire un déficit en T4 sans déficit en T3, affecte spécifiquement le développement du cerveau. Elle entraîne des perturbations de la migration cellulaire, ce qui modifie la cytoarchitecture du cortex somatosensoriel et de l'hippocampe (Morreale de Escobar et al., 1985; Lavado-Autric et al., 2003). Grâce au système rapporteur *FindT3*, nous avons pu mettre en évidence que l'hormone thyroïdienne est active dans le mésencéphale dès E15,5 (cf. article 1).

Pour déterminer l'action de T3 sur le développement du cerveau embryonnaire, il n'existait pas de modèles adéquats dans le laboratoire : l'induction d'une hypothyroïdie précoce signifiait l'induction d'une hypothyroïdie chez la femelle gestante, car la mère est la source de T3 pour l'embryon. Or l'administration de drogues réduisant le niveau de T3 maternelle induit des avortements ou affecte les échanges placentaires, conduisant à des phénotypes embryonnaires artéfactuels (Hendrich and Porterfield, 1996). La suppression de la réponse à T3 directement chez l'embryon constitue une alternative intéressante. Les souris TR $\alpha^{AM/}$ XS expriment dès le début du développement embryonnaire le récepteur TR α 1L400R à action dominante négative. Frédéric Picou, étudiant de master 2 dans notre équipe, a donc utilisé des cerveaux d'embryons TR $\alpha^{AM/+}$ XS (E17,5) pour tester la dérégulation de différents gènes-cibles candidats. Des dérégulations transcriptionnelles sont principalement observées dans le cerveau moyen, où le système *FindT3* a montré une forte activité de T3.

Jusqu'à présent, seuls *Oct1* (Dowling et al., 2000), *NSP-A* (Dowling et al., 2001), *RC3/neurogranine* (Dowling and Zoeller, 2000), l' α -*Internexine* et le *Neurofilament L* (Sampson et al., 2000) étaient connus pour avoir une expression diminuée à E17,5 lors d'hypothyroïdie maternelle. Comme SHH est l'acteur d'une des grandes voies de signalisation gouvernant le neuro-développement embryonnaire (Bertrand and Dahmane, 2006), il s'agissait d'un candidat particulièrement intéressant. Frédéric Picou a montré que l'expression de SHH est diminuée de cinq fois dans le cerveau moyen des souris $TR\alpha^{AM/+}xS$ à E17,5. Or des analyses *ex vivo* ont montré qu'une anomalie embryonnaire de la signalisation de SHH entraîne des altérations post-natales des interneurons corticaux (Xu et al., 2005). La répression embryonnaire de SHH pourrait être responsable de la réduction des interneurons GABAergique différenciés observée dans le cortex et l'hippocampe lors d'hypothyroïdie congénitale (Berbel et al., 1996 □ Guadano-Ferraz et al., 2003). Etant donné qu'il existe différents types d'interneurones dans le cortex (Wonders and Anderson, 2005), il faudrait d'abord vérifier que ce sont les mêmes qui sont sensibles à SHH et à T3.

Frédéric Picou a également mesuré à E17,5 l'expression des nouveaux gènes-cibles de T3 identifiés dans le cervelet post-natal (article 3). L'expression de *Mrg1* en particulier est réduite de trois fois dans le cerveau moyen des embryons $TR\alpha^{AM/+}xS$ par rapport aux sauvages. Or, à P15, ce gène-cible est au contraire activé dans les cervelets hypothyroïdien et $TR\alpha^{AM/+}xS$. Il possède dans son promoteur un *DR4* sur lequel TR se fixe *in vivo* (article 3). Il serait particulièrement intéressant d'étudier cet élément de réponse puisqu'il est potentiellement transformé en élément de réponse négatif au cours du développement post-natal. Les mécanismes impliqués dans la régulation négative pourraient être mieux compris.

III. Intérêt des modèles génétiques générés

A. Utilisation des souris $TR\alpha^{AM}$

Combinées aux nombreuses souris exprimant la recombinaise CRE de façon constitutive ou inductible dans un tissu donné, les souris $TR\alpha^{AM}$ constituent un système général d'inactivation conditionnelle de la signalisation de T3, qui intéresse aujourd'hui de

Tableau 2

Transgène	Types cellulaires exprimant la CRE	Inductibilité par le tamoxifen	Référence	Utilisateur
<i>SYCP1Cre</i>	Spermatocytes I	Non	(Chung et al., 2004)	Laure Quignodon
<i>CagCreERTM</i>	Tous	Oui	(Hayashi and McMahon, 2002)	Laure Quignodon
<i>Cre3</i>	Neurones post-mitotiques	Non	(Banares et al., 2005)	Frédéric Flamant
<i>PDGFRαCreERT2</i>	Précurseurs des oligodendrocytes	Oui	don de M. Richardson	Eva Romero
<i>Otx2CreERT2</i>	Dans le cervelet post-natal : cellules granulaires externes des lobule postérieurs	Oui	(Fossat et al., 2006)	Nicolas Fossat
<i>AlpfpCre</i>	Hépatocytes	Non	(Kellendonk et al., 2000)	Frédéric Flamant
<i>GluCre</i>	Cellules α du pancréas	Non	don de Mori	Frédéric Flamant
<i>HSACre</i>	Myocytes	Non	(Miniau et al., 1999)	Karine Gauthier
<i>Ap2CreERT2</i>	Adipocytes	Oui	(Imai et al., 2001)	Karine Gauthier
<i>VillinCre</i>	Cellules épithéliales de l'intestin	Non	(el Marjou et al., 2004)	Micheline Plateroti
<i>AMHCre</i>	Cellules de Sertoli	Non	(Lecureuil et al., 2002)	Sophie Fouhecourt

nombreux collaborateurs. Comme la mutation est utilisée à l'état hétérozygotes, une nouvelle lignée de souris exprimant TR α 1L400R dans un tissu donné, à un moment donné, est obtenue en une seule génération. Le tableau 2 résume les lignées *Cre* avec lesquelles les souris TR $\alpha^{AM/}$ sont croisées à l'heure actuelle.

Le modèle TR $\alpha^{AM/}$ ne permet cependant pas de supprimer la réponse à T3 dans les organes exprimant majoritairement TR β , par exemple la rétine ou le foie (article 4). Par ailleurs, les récepteurs TR α 1 mutés peuvent perturber d'autres voies de signalisation (cf. introduction II. D.). Le mécanisme le plus souvent observé est une persistance, même en présence de T3, de régulations croisées physiologiques entre TR et d'autres récepteurs nucléaires (PPAR, LXR). Comme ces effets doivent exister aussi lors d'hypothyroïdie, il ne s'agit pas d'une limite du système TR $\alpha^{AM/}$. Les interactions protéiques de TR α 1 ne doivent pas être beaucoup perturbées, hormis bien sur celle avec les coactivateurs, car la mutation TR α 1L400R est une mutation ponctuelle.

B. Intérêt pour disséquer les interactions tissulaires

a. Origine métabolique du phénotype cérébelleux

Une question demeure ouverte□ comment les gènes-cibles indirects de T3 potentiellement responsables du phénotype cérébelleux sont-ils activés□ Comme nous l'avons exposé, le lien entre ces gènes et les gènes-cibles directs de T3 est difficile à établir. Leur dérégulation pourrait en fait résulter d'une altération métabolique. Chez l'adulte, la consommation de glucose est réduite dans le cerveau des souris TR $\alpha I^{PV/+}$ (Itoh et al., 2001). De plus, les souris TR $\alpha I^{R384C/+}$ et TR $\alpha^{AM/+}xS$ ont une clairance accélérée du glucose. Pendant la période post-natal, il est possible qu'une anomalie métabolique périphérique perturbe le développement du cervelet. Le système conditionnel TR $\alpha^{AM/}$ permet de tester une telle hypothèse, basée sur les arguments suivants.

Les peroxyosomes sont des organites dont les fonctions sont triples□détoxification des résidus oxydés, oxydation α et β d'acides gras dont ceux à très longue chaîne et synthèse de

phospholipides, dont les plasmalogènes au rôle inconnu (Visser et al., 2007). L'ablation génétique des péroxysomes par délétion constitutive du gène *Pex2*, qui code pour une peroxine impliquée dans leur biogénèse, induit une réduction de la croissance cérébelleuse, un retard de migration des cellules granulaires externes et un développement anormal des dendrites des cellules de Purkinje (Faust, 2003). Ce phénotype est très similaire à celui observé lors d'hypothyroïdie. Le gène *Pex5* code pour le récepteur d'import de la majorité des protéines matricielles du péroxysome. De façon surprenante, l'inactivation du gène *Pex5* uniquement dans le foie induit le même type d'anomalies dans le cervelet : réduction de sa taille, lamination anormale, retard de migration des cellules granulaires, augmentation de la mort cellulaire et réduction de l'arborisation des cellules de Purkinje (Krysko et al., 2007). Dans le cortex, la migration des neurones est localement altérée chez les knock-out constitutifs de *Pex5*. La surexpression de *Pex5* dans le cerveau ou le foie permet de supprimer ce phénotype *via* une reconstitution locale des péroxysomes, selon un mécanisme moléculaire encore inconnu (Janssen et al., 2003).

Le phénotype cérébelleux des souris dépourvues de péroxysomes seulement dans le foie est très similaire à celui des souris hypothyroïdiennes ou mutantes pour TR α 1. Il est donc possible qu'une atteinte des péroxysomes hépatiques soit impliquée dans la pathogénie de l'hypothyroïdie cérébelleuse. Un immunomarquage de PEX14 ou de la catalase permettrait d'observer une éventuelle réduction des péroxysomes dans le foie des souris TR $\alpha^{AM/+/xS}$. L'expression de TR α 1L400R uniquement dans le foie permettrait de prouver que le métabolisme hépatique est partiellement responsable du phénotype cérébelleux. Si cette hypothèse est confirmée, le mécanisme pourrait reposer sur une régulation croisée entre l'aporrécepteur TR et les PPAR, car ces derniers sont les principaux régulateurs de la prolifération des péroxysomes (Issemann and Green, 1990) *via* notamment l'activation transcriptionnelle directe de *Pex11 α* , un inducteur de la division des péroxysomes (Shimizu et al., 2004). Or les régulations croisées exercées par des TR α 1 mutants sur la voie des PPAR sont bien connues (cf. introduction II. D.).

b. Origine centrale du phénotype métabolique

Si le métabolisme peut affecter le cerveau, la réciproque existe□un phénotype central peut induire un défaut métabolique. Par exemple la maigreur dont souffrent les souris mutantes *TRαI^{PV/+}* (Ying et al., 2007) pourrait s'expliquer par une action de T3 dans le noyau arqué de l'hypothalamus, régulateur central de l'appétit.

T3 est connue pour réguler la thermogenèse indépendante du frisson en activant en réponse au froid l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (Reitman et al., 1999) (cf I. E.). A partir d'homologies structurales, les protéines UCP2 et UCP3 ont été identifiées (Krauss et al., 2005). Si leur action sur la perméabilité de la membrane mitochondriale est moins forte, leur expression est aussi régulée par T3 (Kalderon et al., 1995). Or le noyau arqué de l'hypothalamus exprime fortement UCP2 (Horvath et al., 1999) et les TR (Lechan et al., 1993). Il possède également une capacité locale de synthèse de T3, puisque la *D2* est exprimée localement. Son expression est augmentée par le jeûne (Coppola et al., 2005). Récemment il a été montré que les cellules gliales produisant la *D2* sont en apposition directe avec des neurones orexigéniques exprimant UCP2. Pendant le jeûne, la production de T3 active UCP2 dans ces neurones, ce qui induit une prolifération de leurs mitochondries. Cette prolifération mitochondriale augmente leur excitabilité et provoque la prise alimentaire (Coppola et al., 2007). L'expression d'un *TRα1* muté uniquement dans l'hypothalamus permettrait de tester si ce mécanisme est nécessaire et suffisant pour faire maigrir les souris.

De façon plus générale, l'étude du métabolisme à partir des mutants constitutifs est d'une complexité inouïe, puisque différents phénotypes peuvent se cumuler ou se compenser. Ainsi l'étude des mutants tissu spécifique révèle paradoxalement plus d'anomalies que celles observées pour les mutants constitutifs (Karine Gauthier, communication personnelle). Grâce au système *TRα^{AM/}*, l'expression tissu spécifique de *TRα1L400R* peut révéler des phénotypes encore non décrits.

C. Intérêt pour disséquer les actions développementales et adultes de T3

Les effets de T3 sur le cerveau adulte sont difficiles à comprendre étant donné la difficulté à séparer les effets développementaux et les effets de l'hormone à l'âge adulte (cf. introduction III. B. a. 2). A Madrid, des tests comportementaux sont actuellement réalisés par Cesar Venero et Carmen Grijota sur les souris *TRα^{AM/}xCagCreERTM*, traitées au tamoxifène

à l'âge adulte afin d'induire l'expression ubiquitaire du récepteur TR α 1L400R. Des résultats préliminaires suggèrent que ces souris ont une anxiété augmentée par rapport aux souris TR $\alpha^{AM/+}$ qui ont également reçu des injections de tamoxifène. Si ces résultats étaient confirmés, ils prouveraient que TR α 1 a une action directe sur le cerveau adulte. Il serait intéressant de mesurer chez ces mutants l'expression de gènes-cibles candidats, notamment *GR*. Par ailleurs, la quantification de la neurogénèse dans l'hippocampe permettrait de déterminer si l'action de T3 sur les cellules souches neurales est génomique ou non.

D. Intérêt pour trouver tous les gènes-cibles de TR

Dans de nombreux organes, les gènes-cibles directement régulés par TR et cruciaux pour le développement ne sont pas clairement identifiés. Une combinaison spécifique de cofacteurs de transcription est impliquée dans le remodelage local de la chromatine et l'activation d'un gène-cible par TR. Par conséquent, l'expression des cofacteurs ne doit pas être perturbée dans les modèles utilisés. Ce n'est pas forcément le cas dans des cultures primaires de cellules, c'est pourquoi il est préférable de prélever les cellules directement dans l'organisme. Cependant, l'utilisation de tissu entier risque de masquer les régulations spécifiques d'un type cellulaire. C'est une raison pouvant expliquer le faible nombre de gènes-cibles que nous avons identifié par puce à ADN à partir de cervelets hypothyroïdiens entiers. Pour augmenter la sensibilité de détection, il serait préférable de microdisséquer les cellules dans lesquelles T3 est active. Le principal problème est d'identifier ces cellules cibles. Le système FindT3 pourrait être utilisé pour trier automatiquement les cellules nerveuses dans lesquelles T3 est active.

Le système conditionnel TR α^{AM} permet quant à lui de contrôler la suppression de la réponse à T3 dans le temps et dans l'espace, il peut donc permettre d'identifier la fenêtre de sensibilité à T3 d'un gène-cible ainsi que le type cellulaire dans lequel il est régulé.

E. Intérêt pour la recherche appliquée

a. Pour détecter les perturbateurs endocriniens

Le système *FindT3* est un système rapporteur qui permet de tester la présence d'agonistes ou d'antagonistes de TR dans le cerveau. Etant donné que de nombreux polluants de l'environnement affectent la fonction thyroïdienne (cf. introduction I. B.), nous avons testé l'effet de différents xénobiotiques (la 2,3,7,8-tétraChlorodibenzo-p-dioxine ou TCDD et le bisphénol A) sur la signalisation cérébrale de T3, en exposant les souris *FindT3* gestantes et allaitantes à ces molécules. Le patron d'activité de l'hormone thyroïdienne n'est pas modifié dans le cerveau des petits à P15, laissant espérer que ces molécules n'affectent pas le développement cérébral. Bien que le système *FindT3* ne soit peut-être pas assez sensible, il peut être utilisé dans une première approche pour évaluer les effets cérébraux de perturbateurs thyroïdiens. Il est maintenant possible de visualiser l'expression du gène *LacZ in vivo*, par injection d'un substrat converti en un métabolite fluorescent par la β GALACTOSIDASE. Cependant la résolution n'est pas suffisante à l'heure actuelle pour observer des variations du patron d'activité de T3 directement sur les souris *FindT3* vivantes.

Les nouveaux gènes-cibles identifiés dans le cervelet post-natal, qu'ils soient directs ou indirects, sont des marqueurs de l'hypothyroïdie cérébelleuse à P15. Etant donné que les gènes-cibles de T3 diffèrent selon la période de développement et l'organe, la possibilité de disposer de nouveaux marqueurs permet de mieux caractériser l'effet des xénobiotiques sur la signalisation thyroïdienne.

b. Pour proposer un dépistage précoce de l'hypothyroïdie maternelle

Dès E17,5, T3 active des gènes-cibles dans le cerveau moyen du fœtus de souris. Le système *FindT3* a montré que la T3 d'origine maternelle est active dès E15,5 dans cette région. Comme il existe une correspondance entre les stades de développement embryonnaire murins et humains (Galton, 2005), il est possible de prédire que l'activité de la T3 maternelle commence dans le cerveau humain avant la douzième semaine de grossesse. Cependant, l'hypothyroïdie n'est diagnostiquée qu'à la naissance. Récemment l'Association Américaine de la Thyroïde a recommandé l'apport d'un complément iodé quotidien pendant la grossesse et l'allaitement (Becker et al., 2006). Il serait plutôt souhaitable de réaliser un dosage systématique de la T3 et la T4 tout au long de la grossesse, puisqu'une diminution du niveau

de T4 n'entraîne pas de symptômes cliniques chez la mère mais peut affecter le neurodéveloppement du fœtus (Lavado-Autric et al., 2003).

F. Conclusion

Pour déterminer le patron d'activité de l'hormone thyroïdienne au cours du développement du cerveau, nous avons utilisé des souris transgéniques. Les résultats obtenus ont montré une activité précoce, encore inconnue, dans le mésencéphale de l'embryon et une activité extrêmement hétérogène dans le cerveau post-natal. Pour comprendre sa fonction, un nouveau modèle murin a été généré□ il permet de supprimer la réponse à l'hormone thyroïdienne dans un type cellulaire donné, à différents stades de développement par expression conditionnelle d'un récepteur TR α 1 muté. Ce modèle devrait permettre de disséquer les actions de T3 dans tous les organes au cours du développement et chez l'adulte, hormis les organes exprimant majoritairement TR β .

CONCLUSION GENERALE

La génétique de la souris permet d'analyser la fonction des gènes *in vivo*. Grâce à elle, nous avons précisé le mécanisme d'action du récepteur de l'hormone thyroïdienne TR α 1. Le phénotype faible des souris invalidées pour ce récepteur a temporairement conduit à surestimer l'importance des différentes isoformes de TR et / ou l'importance des effets non génomiques de l'hormone thyroïdienne. A partir des résultats expérimentaux disponibles au début de cette thèse, nous avons privilégié l'hypothèse que la pathogénie de l'hypothyroïdie soit essentiellement due à l'effet répressif de TR α 1 en absence de ligand. Cette hypothèse implique un changement radical de paradigme. En effet, la signalisation de l'hormone thyroïdienne a souvent été réduite à l'action de son ligand. Initialement, T3 a été caractérisée comme l'hormone capable de déclencher et d'amplifier l'activité des TR au cours de la métamorphose du Xénope. Ce concept a sans doute constitué un obstacle épistémologique important dans la compréhension du mécanisme d'action des TR. Ce travail expérimental prouve que ces récepteurs ne sont donc pas uniquement des effecteurs de la réponse à T3. TR α exerce un effet répresseur physiologique sur la fonction cardiaque embryonnaire. Par ailleurs, l'expression constitutive d'un récepteur muté TR α 1L400R, incapable d'activer la transcription en présence de T3, reproduit partiellement le phénotype hypothyroïdien. En absence de ligand, l'aporécepteur TR α 1 exerce donc des effets physiologiques et pathologiques au cours du développement de la souris.

Le système CRE/*loxP* que nous avons utilisé pour générer des souris exprimant de façon conditionnelle le récepteur TR α 1L400R est un système révolutionnaire. Il est maintenant possible d'induire une modification génétique donnée, à un moment donné, dans un type cellulaire donné. Or le génome est souvent considéré comme un élément prédéterminé lors de la conception d'un individu, c'est pourquoi il est particulièrement frappant de pouvoir le modifier de façon ciblée simplement par une injection de tamoxifène. Sur le plan pratique, le système permet de répondre à une multitude de questions. Ainsi le système TR α ^{AM} permettra de disséquer l'action de T3 dans un grand nombre de tissus, pendant le développement ou chez l'adulte. Chaque lignée de souris *Cre* permet d'adresser une question différente. La technologie est souvent considérée comme devant répondre à une question précise, or elle génère en elle-même des questions nouvelles. Par exemple, l'expression du

récepteur TR α 1L400R de façon ubiquitaire ou restreinte dans le muscle induit des anomalies opposées de la clairance du glucose. Le récepteur exerce donc des actions tissulaires à effets antagonistes, qui peuvent maintenant être caractérisées et comprises.

L'hormone thyroïdienne a longtemps été considérée comme un facteur trophique au cours du développement. Grâce à un système rapporteur pour l'activité de T3, nous avons montré que T3 a une action très hétérogène dans le cerveau pré et post-natal. Elle doit donc être un facteur informatif pour le neurodéveloppement. Par diverses approches, nous avons montré que T3 régule directement l'expression d'un petit nombre de gènes-cibles dans le cervelet post-natal. Malgré le nombre probablement élevé de sites sur lesquels TR se fixe dans le génome, les nombreuses régulations exercées sur le complexe allostérique RXR / TR / T3 permettent de restreindre l'action de T3 à un petit nombre de gènes-cibles directs. Ceux que nous avons identifiés ne sont pas des acteurs majeurs du neurodéveloppement. Par ailleurs la suppression de la réponse à T3 dans les cellules granulaires externes ne perturbe pas leur migration. Lors d'hypothyroïdie, le retard de migration des cellules granulaire externe résulte donc d'une action indirecte de l'hormone. A partir de ces arguments, nous proposons que le mécanisme d'action moléculaire de T3 dans le cervelet repose sur une signalisation en cascade, impliquant des interactions cellulaires. Comme nous l'avons exposé, cette cascade pourrait avoir pour origine une anomalie métabolique centrale ou périphérique. Le système TR α^{AM} permettra de répondre à cette question.

De façon plus générale, les études réalisées sur le récepteur TR α 1 nous ont conduit à considérer comme désuète la séparation fonctionnelle établie entre les différents récepteurs nucléaires à activité dépendante d'un ligand. Les TR sont considérés comme des récepteurs à localisation nucléaire en présence ou en absence de T3. Or ils réalisent une navette permanente entre le noyau et le cytoplasme. Les récepteurs stéroïdiens sont quant à eux considérés comme des récepteurs cytoplasmiques en absence de ligand. Or des expériences récentes d'immunoprécipitation de la chromatine à grande échelle ont montré qu'ER est fixé sur l'ADN en absence de son ligand et il peut réprimer l'expression de gènes-cibles. La distinction entre les deux types de récepteurs est aujourd'hui discutable. Dans le domaine de la biologie moléculaire où les représentations mentales sont nécessaires pour appréhender les mécanismes invisibles, il est nécessaire de remettre en cause les schémas inculqués.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, E., R.C. Mariani, W. Yu, X.B. Wu, T. Ando, Y. Li, J. Iqbal, L. Eldeiry, G. Rajendren, H.C. Blair, T.F. Davies, and M. Zaidi. 2003. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell* 115:151-62.
- Abel, E.D., H.C. Kaulbach, A. Campos-Barros, R.S. Ahima, M.E. Boers, K. Hashimoto, D. Forrest, and F.E. Wondisford. 1999a. Novel insight from transgenic mice into thyroid hormone resistance and the regulation of thyrotropin. *J Clin Invest* 103:271-9.
- Abel, E.D., M.E. Boers, C. Pazos-Moura, E. Moura, H. Kaulbach, M. Zakaria, B. Lowell, S. Radovick, M.C. Liberman, and F. Wondisford. 1999b. Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system. *J Clin Invest* 104:291-300.
- Adan, R.A., J.J. Cox, J.P. van Kats, and J.P. Burbach. 1992. Thyroid hormone regulates the oxytocin gene. *J Biol Chem* 267:3771-7.
- Ahlgren, S.C., H. Wallace, J. Bishop, C. Neophytou, and M.C. Raff. 1997. Effects of thyroid hormone on embryonic oligodendrocyte precursor cell development in vivo and in vitro. *Mol Cell Neurosci* 9:420-32.
- Alvarez-Dolado, M., M. Gonzalez-Moreno, A. Valencia, M. Zenke, J. Bernal, and A. Munoz. 1999a. Identification of a mammalian homologue of the fungal Tom70 mitochondrial precursor protein import receptor as a thyroid hormone-regulated gene in specific brain regions. *J Neurochem* 73:2240-9.
- Alvarez-Dolado, M., M. Ruiz, J.A. Del Rio, S. Alcantara, F. Burgaya, M. Sheldon, K. Nakajima, J. Bernal, B.W. Howell, T. Curran, E. Soriano, and A. Munoz. 1999b. Thyroid hormone regulates reelin and *dab1* expression during brain development. *J Neurosci* 19:6979-93.
- Ambrogini, P., R. Cuppini, P. Ferri, C. Mancini, S. Ciaroni, A. Voci, E. Gerdoni, and G. Gallo. 2005. Thyroid Hormones Affect Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Adult Rat. *Neuroendocrinology* 81:244-253.
- Angelin-Duclos, C., C. Domenget, A. Kolbus, H. Beug, P. Jurdic, and J. Samarut. 2005. Thyroid hormone T3 acting through the thyroid hormone alpha receptor is necessary for implementation of erythropoiesis in the neonatal spleen environment in the mouse. *Development* 132:925-34.
- Anway, M.D., C. Leathers, and M.K. Skinner. 2006. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 147:5515-23.
- Araki, O., H. Ying, F. Furuya, X. Zhu, and S.Y. Cheng. 2005a. Thyroid hormone receptor {beta} mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16251-6.
- Araki, O., H. Ying, F. Furuya, X. Zhu, and S.Y. Cheng. 2005b. Thyroid hormone receptor beta mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16251-6.
- Aranda, A., and A. Pascual. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-304.
- Ayotte, P., G. Muckle, J.L. Jacobson, S.W. Jacobson, and E. Dewailly. 2003. Assessment of pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls: lessons from the Inuit Cohort Study. *Environ Health Perspect* 111:1253-8.
- Baas, D., D. Bourbeau, L.L. Sarlieve, M.E. Ittel, J.H. Dussault, and J. Puymirat. 1997. Oligodendrocyte maturation and progenitor cell proliferation are independently regulated by thyroid hormone. *Glia* 19:324-32.

- Balkan, W., M. Colbert, C. Bock, and E. Linney. 1992. Transgenic indicator mice for studying activated retinoic acid receptors during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3347-51.
- Ball, S.G., J. Sokolov, and W.W. Chin. 1997. 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J Mol Endocrinol* 19:137-47.
- Banares, S., K. Zeh, M. Krajewska, P. Kermer, H. Baribault, J.C. Reed, and S. Krajewski. 2005. Novel pan-neuronal Cre-transgenic line for conditional ablation of genes in the nervous system. *Genesis* 42:6-16.
- Banovac, K., and E. Koren. 2000. Triiodothyronine stimulates the release of membrane-bound alkaline phosphatase in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 67:460-5.
- Barish, G.D., M. Downes, W.A. Alaynick, R.T. Yu, C.B. Ocampo, A.L. Bookout, D.J. Mangelsdorf, and R.M. Evans. 2005. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* 19:2466-77.
- Barlow, C., B. Meister, M. Lardelli, U. Lendahl, and B. Vennstrom. 1994. Thyroid abnormalities and hepatocellular carcinoma in mice transgenic for v-erbA. *Embo J* 13:4241-50.
- Barolo, S., and J.W. Posakony. 2002. Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes Dev* 16:1167-81.
- Bartels, P.D., and L. Sestoft. 1980. Thyroid hormone-induced changes in gluconeogenesis and ketogenesis in perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 633:56-67.
- Bassett, J.H., C.B. Harvey, and G.R. Williams. 2003. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 213:1-11.
- Bassett, J.H., J. O'Shea P, S. Sriskantharajah, B. Rabier, A. Boyde, P.G. Howell, R.E. Weiss, J.P. Roux, L. Malaval, P. Clement-Lacroix, J. Samarut, O. Chassande, and G.R. Williams. 2007. Thyroid hormone excess rather than TSH deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism. *Mol Endocrinol*.
- Bates, B., M. Rios, A. Trump, C. Chen, G. Fan, J.M. Bishop, and R. Jaenisch. 1999. Neurotrophin-3 is required for proper cerebellar development. *Nat Neurosci* 2:115-7.
- Baumann, C.T., P. Maruvada, G.L. Hager, and P.M. Yen. 2001. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem* 276:11237-45.
- Baxter, J.D., P. Webb, G. Grover, and T.S. Scanlan. 2004. Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. *Trends Endocrinol Metab* 15:154-7.
- Becker, D.V., L.E. Braverman, F. Delange, J.T. Dunn, J.A. Franklyn, J.G. Hollowell, S.H. Lamm, M.L. Mitchell, E. Pearce, J. Robbins, and J.F. Rovet. 2006. Iodine supplementation for pregnancy and lactation-United States and Canada: recommendations of the american thyroid association. *Thyroid* 16:949-51.
- Berbel, P., P. Marco, J.R. Cerezo, and J. DeFelipe. 1996. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats. *Neurosci Lett* 204:65-8.
- Bergh, J.J., H.Y. Lin, L. Lansing, S.N. Mohamed, F.B. Davis, S. Mousa, and P.J. Davis. 2005. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146:2864-71.
- Berkenstam, A., M. Farnegardh, and J.A. Gustafsson. 2004. Convergence of lipid homeostasis through liver X and thyroid hormone receptors. *Mech Ageing Dev* 125:707-17.
- Bernal, J. 2002. Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest* 25:268-88.
- Bernal, J., and F. Pekonen. 1984. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. *Endocrinology* 114:677-9.

- Bertrand, N., and N. Dahmane. 2006. Sonic hedgehog signaling in forebrain development and its interactions with pathways that modify its effects. *Trends Cell Biol* 16:597-605.
- Bertrand, S., F.G. Brunet, H. Escriva, G. Parmentier, V. Laudet, and M. Robinson-Rechavi. 2004. Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. *Mol Biol Evol* 21:1923-37.
- Billon, N., C. Jolicoeur, Y. Tokumoto, B. Vennstrom, and M. Raff. 2002. Normal timing of oligodendrocyte development depends on thyroid hormone receptor alpha 1 (TRalpha1). *Embo J* 21:6452-6460.
- Bonamy, G.M., A. Guiochon-Mantel, and L.A. Allison. 2005. Cancer promoted by the oncoprotein v-ErbA may be due to subcellular mislocalization of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 19:1213-30.
- Bondy, C.A., and W.H. Lee. 1993. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 692:33-43.
- Bookout, A.L., Y. Jeong, M. Downes, R.T. Yu, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf. 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126:789-99.
- Bradley, D.J., H.C. Towle, and W.S. Young, 3rd. 1992. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 12:2288-302.
- Bradley, D.J., H.C. Towle, and W.S. Young, 3rd. 1994. Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:439-43.
- Brodie, C. 1990. Regulation by thyroid hormones of glucose transport in cultured rat myotubes. *J Neurochem* 55:186-91.
- Brown, D.D. 2005. The role of deiodinases in amphibian metamorphosis. *Thyroid* 15:815-21.
- Brown, S.B., M. Maloney, and W.B. Kinlaw. 1997. "Spot 14" protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose. *J Biol Chem* 272:2163-6.
- Buchholz, D.R., B.D. Paul, and Y.B. Shi. 2005. Gene-specific changes in promoter occupancy by thyroid hormone receptor during frog metamorphosis: Implications for developmental gene regulation. *J Biol Chem*.
- Buchholz, D.R., B.D. Paul, L. Fu, and Y.B. Shi. 2006. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *Gen Comp Endocrinol* 145:1-19.
- Bunn, C.F., J.A. Neidig, K.E. Freidinger, T.A. Stankiewicz, B.S. Weaver, J. McGrew, and L.A. Allison. 2001. Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor alpha. *Mol Endocrinol* 15:512-33.
- Burgos-Trinidad, M., and R.J. Koenig. 1999. Dominant negative activity of thyroid hormone receptor variant alpha2 and interaction with nuclear corepressors. *Mol Cell Endocrinol* 149:107-14.
- Buroker, N.E., M.E. Young, C. Wei, K. Serikawa, M. Ge, X.H. Ning, and M.A. Portman. 2007. The dominant negative thyroid hormone receptor beta-mutant {Delta}337T alters PPAR{alpha} signaling in heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E453-60.
- Buyukgebiz, A. 2006. Newborn screening for congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 19:1291-8.
- Buzzard, J.J., P.G. Farnworth, D.M. De Kretser, A.E. O'Connor, N.G. Wreford, and J.R. Morrison. 2003. Proliferative phase sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. *Endocrinology* 144:474-83.

- Capdevila, J., T. Tsukui, C. Rodriguez Esteban, V. Zappavigna, and J.C. Izpisua Belmonte. 1999. Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol Cell* 4:839-49.
- Carosa, E., A. Fanelli, S. Ulisse, R. Di Lauro, J.E. Rall, and E.A. Jannini. 1998. Ciona intestinalis nuclear receptor 1: a member of steroid/thyroid hormone receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11152-7.
- Carranza, D., G. Van Vliet, and M. Polak. 2006. [Congenital hypothyroidism]. *Ann Endocrinol (Paris)* 67:295-302.
- Carroll, J.S., C.A. Meyer, J. Song, W. Li, T.R. Geistlinger, J. Eeckhoutte, A.S. Brodsky, E.K. Keeton, K.C. Fertuck, G.F. Hall, Q. Wang, S. Bekiranov, V. Sementchenko, E.A. Fox, P.A. Silver, T.R. Gingeras, X.S. Liu, and M. Brown. 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38:1289-97.
- Casas, F., P. Rochard, A. Rodier, I. Cassar-Malek, S. Marchal-Victorion, R.J. Wiesner, G. Cabello, and C. Wrutniak. 1999. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol Cell Biol* 19:7913-24.
- Casas, F., M. Busson, S. Grandemange, P. Seyer, A. Carazo, L. Pessemesse, C. Wrutniak-Cabello, and G. Cabello. 2006. Characterization of a novel thyroid hormone receptor alpha variant involved in the regulation of myoblast differentiation. *Mol Endocrinol* 20:749-63.
- Castillo, A.I., R. Sanchez-Martinez, J.L. Moreno, O.A. Martinez-Iglesias, D. Palacios, and A. Aranda. 2004. A permissive retinoid X receptor/thyroid hormone receptor heterodimer allows stimulation of prolactin gene transcription by thyroid hormone and 9-cis-retinoic acid. *Mol Cell Biol* 24:502-13.
- Chan, I.H., and M.L. Privalsky. 2006. Thyroid hormone receptors mutated in liver cancer function as distorted antimorphs. *Oncogene* 25:3576-88.
- Chan, S., and M.D. Kilby. 2000. Thyroid hormone and central nervous system development. *J Endocrinol* 165:1-8.
- Chandrasekaran, C., C.M. Coopersmith, and J.I. Gordon. 1996. Use of normal and transgenic mice to examine the relationship between terminal differentiation of intestinal epithelial cells and accumulation of their cell cycle regulators. *J Biol Chem* 271:28414-21.
- Chang, L., and L.N. Wei. 1997. Characterization of a negative response DNA element in the upstream region of the cellular retinoic acid-binding protein-I gene of the mouse. *J Biol Chem* 272:10144-50.
- Charrasse, S., F. Jehan, C. Confort, P. Brachet, and J. Clos. 1992. Thyroid hormone promotes transient nerve growth factor synthesis in rat cerebellar neuroblasts. *Dev Neurosci* 14:282-9.
- Chassande, O., A. Fraichard, K. Gauthier, F. Flamant, C. Legrand, P. Savatier, V. Laudet, and J. Samarut. 1997. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor- alpha and triiodothyronine receptor activities [In Process Citation]. *Mol Endocrinol* 11:1278-90.
- Chen, Y., P.L. Chen, C.F. Chen, Z.D. Sharp, and W.H. Lee. 1999. Thyroid hormone, T3-dependent phosphorylation and translocation of Trip230 from the Golgi complex to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4443-8.
- Cheng, J., P. Kapranov, J. Drenkow, S. Dike, S. Brubaker, S. Patel, J. Long, D. Stern, H. Tammana, G. Helt, V. Sementchenko, A. Piccolboni, S. Bekiranov, D.K. Bailey, M. Ganesh, S. Ghosh, I. Bell, D.S. Gerhard, and T.R. Gingeras. 2005. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308:1149-54.

- Cheng, S.Y. 2003. Thyroid hormone receptor mutations in cancer. *Mol Cell Endocrinol* 213:23-30.
- Cheng, S.Y., Q.H. Gong, C. Parkison, E.A. Robinson, E. Appella, G.T. Merlino, and I. Pastan. 1987. The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262:11221-7.
- Chiellini, G., S. Frascarelli, S. Ghelardoni, V. Carnicelli, S.C. Tobias, A. Debarber, S. Brogioni, S. Ronca-Testoni, E. Cerbai, D.K. Grandy, T.S. Scanlan, and R. Zucchi. 2007. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function. *Faseb J*.
- Chrysis, D., A.S. Calikoglu, P. Ye, and A.J. D'Ercole. 2001. Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci* 21:1481-9.
- Chung, S.S., F. Cuzin, M. Rassoulzadegan, and D.J. Wolgemuth. 2004. Primary spermatocyte-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Transgenic Res* 13:289-94.
- Clos, J., and J. Legrand. 1973. Effects of thyroid deficiency on the different cell populations of the cerebellum in the young rat. *Brain Res* 63:450-5.
- Clos, J., C. Legrand, J. Legrand, M.S. Ghandour, G. Labourdette, G. Vincendon, and G. Gombos. 1982. Effects of thyroid state and undernutrition on S100 protein and astroglia development in rat cerebellum. *Dev Neurosci* 5:285-92.
- Cohen, R.N., S. Brzostek, B. Kim, M. Chorev, F.E. Wondisford, and A.N. Hollenberg. 2001. The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol Endocrinol* 15:1049-61.
- Colbert, M.C., E. Linney, and A.S. LaMantia. 1993. Local sources of retinoic acid coincide with retinoid-mediated transgene activity during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6572-6.
- Cooke, P.S., and E. Meisami. 1991. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology* 129:237-43.
- Coppola, A., J. Hughes, E. Esposito, L. Schiavo, R. Meli, and S. Diano. 2005. Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett* 579:4654-8.
- Coppola, A., Z.W. Liu, Z.B. Andrews, E. Paradis, M.C. Roy, J.M. Friedman, D. Ricquier, D. Richard, T.L. Horvath, X.B. Gao, and S. Diano. 2007. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5:21-33.
- Crepel, F. 1975. Consequences of hypothyroidism during infancy on the function of cerebellar neurons in the adult rat. *Brain Res* 85:157-60.
- Croteau, W., J.C. Davey, V.A. Galton, and D.L. St Germain. 1996. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 98:405-17.
- Dace, A., L. Zhao, K.S. Park, T. Furuno, N. Takamura, M. Nakanishi, B.L. West, J.A. Hanover, and S. Cheng. 2000. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8985-90.
- Dahmane, N., and A. Ruiz i Altaba. 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126:3089-100.
- Darimont, B.D., R.L. Wagner, J.W. Apriletti, M.R. Stallcup, P.J. Kushner, J.D. Baxter, R.J. Fletterick, and K.R. Yamamoto. 1998. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 12:3343-56.

- Daujat, S., U.M. Bauer, V. Shah, B. Turner, S. Berger, and T. Kouzarides. 2002. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* 12:2090-7.
- Davey, K.G. 2000. Do thyroid hormones function in insects? *Insect Biochem Mol Biol* 30:877-84.
- Davis, P.J., and F.B. Davis. 1996. Nongenomic actions of thyroid hormones. *Thyroid* 6:497-504.
- Davis, P.J., A. Shih, H.Y. Lin, L.J. Martino, and F.B. Davis. 2000. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem* 275:38032-9.
- De Felice, M., C. Ovitt, E. Biffali, A. Rodriguez-Mallon, C. Arra, K. Anastassiadis, P.E. Macchia, M.G. Mattei, A. Mariano, H. Scholer, V. Macchia, and R. Di Lauro. 1998. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 19:395-8.
- Dehal, P., Y. Satou, R.K. Campbell, J. Chapman, B. Degnan, A. De Tomaso, B. Davidson, A. Di Gregorio, M. Gelpke, D.M. Goodstein, N. Harafuji, K.E. Hastings, I. Ho, K. Hotta, W. Huang, T. Kawashima, P. Lemaire, D. Martinez, I.A. Meinertzhagen, S. Necula, M. Nonaka, N. Putnam, S. Rash, H. Saiga, M. Satake, A. Terry, L. Yamada, H.G. Wang, S. Awazu, K. Azumi, J. Boore, M. Branno, S. Chin-Bow, R. DeSantis, S. Doyle, P. Francino, D.N. Keys, S. Haga, H. Hayashi, K. Hino, K.S. Imai, K. Inaba, S. Kano, K. Kobayashi, M. Kobayashi, B.I. Lee, K.W. Makabe, C. Manohar, G. Matassi, M. Medina, Y. Mochizuki, S. Mount, T. Morishita, S. Miura, A. Nakayama, S. Nishizaka, H. Nomoto, F. Ohta, K. Oishi, I. Rigoutsos, M. Sano, A. Sasaki, Y. Sasakura, E. Shoguchi, T. Shin-i, A. Spagnuolo, D. Stainier, M.M. Suzuki, O. Tassy, N. Takatori, M. Tokuoka, K. Yagi, F. Yoshizaki, S. Wada, C. Zhang, P.D. Hyatt, F. Larimer, C. Detter, N. Doggett, T. Glavina, T. Hawkins, P. Richardson, S. Lucas, Y. Kohara, M. Levine, N. Satoh, and D.S. Rokhsar. 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298:2157-67.
- Dellovade, T.L., Y.S. Zhu, and D.W. Pfaff. 1999. Thyroid hormones and estrogen affect oxytocin gene expression in hypothalamic neurons. *J Neuroendocrinol* 11:1-10.
- Dellovade, T.L., J. Chan, B. Vennstrom, D. Forrest, and D.W. Pfaff. 2000. The two thyroid hormone receptor genes have opposite effects on estrogen-stimulated sex behaviors. *Nat Neurosci* 3:472-5.
- Denver, R.J. 1988. Several hypothalamic peptides stimulate in vitro thyrotropin secretion by pituitaries of anuran amphibians. *Gen Comp Endocrinol* 72:383-93.
- Denver, R.J., L. Ouellet, D. Furling, A. Kobayashi, Y. Fujii-Kuriyama, and J. Puymirat. 1999. Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system. Evidence for a role in neurite outgrowth. *J Biol Chem* 274:23128-34.
- Deol, M.S. 1973. An experimental approach to the understanding and treatment of hereditary syndromes with congenital deafness and hypothyroidism. *J Med Genet* 10:235-42.
- Desouza, L.A., U. Ladiwala, S.M. Daniel, S. Agashe, R.A. Vaidya, and V.A. Vaidya. 2005. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 29:414-26.
- Desvergne, B. 1994. How do thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements? *Mol Cell Endocrinol* 100:125-31.
- Desvergne, B. 2007. RXR: From Partnership to Leadership in Metabolic Regulations. *Vitam Horm* 75:1-32.
- Dong, H., M. Wade, A. Williams, A. Lee, G.R. Douglas, and C. Yauk. 2005. Molecular insight into the effects of hypothyroidism on the developing cerebellum. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1182-93.

- Dowling, A.L., and R.T. Zoeller. 2000. Thyroid hormone of maternal origin regulates the expression of RC3/neurogranin mRNA in the fetal rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 82:126-32.
- Dowling, A.L., E.A. Iannaccone, and R.T. Zoeller. 2001. Maternal hypothyroidism selectively affects the expression of neuroendocrine-specific protein A messenger ribonucleic acid in the proliferative zone of the fetal rat brain cortex. *Endocrinology* 142:390-9.
- Dowling, A.L., G.U. Martz, J.L. Leonard, and R.T. Zoeller. 2000. Acute changes in maternal thyroid hormone induce rapid and transient changes in gene expression in fetal rat brain. *J Neurosci* 20:2255-65.
- Dressel, U., D. Thormeyer, B. Altincicek, A. Paululat, M. Eggert, S. Schneider, S.P. Tenbaum, R. Renkawitz, and A. Baniahmad. 1999. Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19:3383-94.
- Dubaniewicz, A., H. Kaciuba-Uscilko, K. Nazar, and L. Budohoski. 1989. Sensitivity of the soleus muscle to insulin in resting and exercising rats with experimental hypo- and hyper-thyroidism. *Biochem J* 263:243-7.
- Duma, D., C.M. Jewell, and J.A. Cidlowski. 2006. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:11-21.
- Dumitrescu, A.M., X.H. Liao, R.E. Weiss, K. Millen, and S. Refetoff. 2006. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* 147:4036-43.
- Dumitrescu, A.M., X.H. Liao, M.S. Abdullah, J. Lado-Abeal, F.A. Majed, L.C. Moeller, G. Boran, L. Schomburg, R.E. Weiss, and S. Refetoff. 2005. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet* 37:1247-52.
- Durand, B., and M. Raff. 2000. A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* 22:64-71.
- Eckey, M., W. Hong, M. Papaioannou, and A. Baniahmad. 2007. The nucleosome assembly activity of NAP1 is enhanced by Alien. *Mol Cell Biol*.
- Edelman, I.S. 1974. Thyroid thermogenesis. *N Engl J Med* 290:1303-8.
- Edwards, J.G., J.J. Bahl, I.L. Flink, S.Y. Cheng, and E. Morkin. 1994. Thyroid hormone influences beta myosin heavy chain (beta MHC) expression. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1482-8.
- el Marjou, F., K.P. Janssen, B.H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger, and S. Robine. 2004. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39:186-93.
- Elder, D.A., A.F. Karayal, A.J. D'Ercole, and A.S. Calikoglu. 2000. Effects of hypothyroidism on insulin-like growth factor-I expression during brain development in mice. *Neurosci Lett* 293:99-102.
- Engelhard, A., and A.M. Christiano. 2004. The hairless promoter is differentially regulated by thyroid hormone in keratinocytes and neuroblastoma cells. *Exp Dermatol* 13:257-64.
- Engler, H., A. Taurog, C. Luthy, and M.L. Dorris. 1983. Reversible and irreversible inhibition of thyroid peroxidase-catalyzed iodination by thioureyline drugs. *Endocrinology* 112:86-95.
- Escher, N., R. Kob, S.P. Tenbaum, M. Eisold, A. Baniahmad, F.V. Eggeling, and C. Melle. 2007. Various Members of the E2F Transcription Factor Family Interact in vivo with the Corepressor Alien. *J Proteome Res* 6:1158-1164.
- Essner, J.J., J.J. Breuer, R.D. Essner, S.C. Fahrenkrug, and P. Hackett, Jr. 1997a. The zebrafish thyroid hormone receptor alpha 1 is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. *Differentiation* 62:107-17.

- Essner, J.J., J.J. Breuer, R.D. Essner, S.C. Fahrenkrug, and P.B. Hackett, Jr. 1997b. The zebrafish thyroid hormone receptor alpha 1 is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. *Differentiation* 62:107-17.
- Farsetti, A., B. Desvergne, P. Hallenbeck, J. Robbins, and V.M. Nikodem. 1992. Characterization of myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter. *J Biol Chem* 267:15784-8.
- Farwell, A.P., S.A. Dubord-Tomasetti, A.Z. Pietrzykowski, and J.L. Leonard. 2006. Dynamic Non-Genomic Actions Of Thyroid Hormone In The Developing Rat Brain. *Endocrinology* 147:2567-2574.
- Farwell, A.P., S.A. Dubord-Tomasetti, A.Z. Pietrzykowski, S.J. Stachelek, and J.L. Leonard. 2005. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. *Brain Res Dev Brain Res* 154:121-35.
- Faust, P.L. 2003. Abnormal cerebellar histogenesis in PEX2 Zellweger mice reflects multiple neuronal defects induced by peroxisome deficiency. *J Comp Neurol* 461:394-413.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, and P. Chambon. 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887-90.
- Feng, W., R.C. Ribeiro, R.L. Wagner, H. Nguyen, J.W. Apriletti, R.J. Fletterick, J.D. Baxter, P.J. Kushner, and B.L. West. 1998. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280:1747-9.
- Feng, X., Y. Jiang, P. Meltzer, and P.M. Yen. 2001. Transgenic targeting of a dominant negative corepressor to liver blocks basal repression by thyroid hormone receptor and increases cell proliferation. *J Biol Chem* 276:15066-72.
- Ferre, P. 2004. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53 Suppl 1:S43-50.
- Filipcik, P., H. Saito, and H. Katsuki. 1994. 3,5,3'-L-triiodothyronine promotes survival and axon elongation of embryonic rat septal neurons. *Brain Res* 647:148-52.
- Flamant, F., and J. Samarut. 1998. Involvement of thyroid hormone and its alpha receptor in avian neurulation. *Dev Biol* 197:1-11.
- Flamant, F., and J. Samarut. 2003. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 14:85-90.
- Flamant, F., K. Gauthier, and J. Samarut. 2006a. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol*.
- Flamant, F., K. Gauthier, and J. Samarut. 2007. Thyroid Hormones Signaling Is Getting More Complex: STORMs Are Coming. *Mol Endocrinol* 21:321-333.
- Flamant, F., A.L. Poguet, M. Plateroti, O. Chassande, K. Gauthier, N. Streichenberger, A. Mansouri, and J. Samarut. 2002. Congenital Hypothyroid Pax8(-/-) Mutant Mice Can Be Rescued by Inactivating the TRalpha Gene. *Mol Endocrinol* 16:24-32.
- Flamant, F., J.D. Baxter, D. Forrest, S. Refetoff, H. Samuels, T.S. Scanlan, B. Vennstrom, and J. Samarut. 2006b. International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol Rev* 58:705-11.
- Flores-Morales, A., H. Gullberg, L. Fernandez, N. Stahlberg, N.H. Lee, B. Vennstrom, and G. Norstedt. 2002. Patterns of Liver Gene Expression Governed by TRbeta. *Mol Endocrinol* 16:1257-68.
- Forrest, D. 1996. Deafness and goiter: molecular genetic considerations. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2764-7.
- Forrest, D., F. Hallbook, H. Persson, and B. Vennstrom. 1991. Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes. *Embo J* 10:269-75.

- Forrest, D., E. Hanebuth, R.J. Smeyne, N. Everds, C.L. Stewart, J.M. Wehner, and T. Curran. 1996. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *Embo J* 15:3006-15.
- Fossat, N., G. Chatelain, G. Brun, and T. Lamonerie. 2006. Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep* 7:824-30.
- Fraichard, A., O. Chassande, M. Plateroti, J.P. Roux, J. Trouillas, C. Dehay, C. Legrand, K. Gauthier, M. Kedinger, L. Malaval, B. Rousset, and J. Samarut. 1997. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production [In Process Citation]. *Embo J* 16:4412-20.
- Freeman, D.A., B.J. Teubner, C.D. Smith, and B.J. Prendergast. 2007. Exogenous T3 mimics long day lengths in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Freund, J.N., C. Domon-Dell, M. Kedinger, and I. Duluc. 1998. The *Cdx-1* and *Cdx-2* homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol* 76:957-69.
- Friesema, E.C., S. Ganguly, A. Abdalla, J.E. Manning Fox, A.P. Halestrap, and T.J. Visser. 2003. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278:40128-35.
- Fujiwara, H., K. Tatsumi, K. Miki, T. Harada, K. Miyai, S. Takai, and N. Amino. 1997. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. *Nat Genet* 16:124-5.
- Furlow, J.D., and E.S. Neff. 2006. A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends Endocrinol Metab* 17:40-7.
- Furumoto, H., H. Ying, G.V. Chandramouli, L. Zhao, R.L. Walker, P.S. Meltzer, M.C. Willingham, and S.Y. Cheng. 2005. An unliganded thyroid hormone beta receptor activates the cyclin D1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma/E2F pathway and induces pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 25:124-35.
- Furuya, F., J.A. Hanover, and S.Y. Cheng. 2006. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1780-5.
- Furuya, F., H. Ying, L. Zhao, and S.Y. Cheng. 2007. Novel functions of thyroid hormone receptor mutants: Beyond nucleus-initiated transcription. *Steroids* 72:171-9.
- Galton, V.A. 2005. The roles of the iodothyronine deiodinases in Mammalian development. *Thyroid* 15:823-34.
- Gambke, B., G.E. Lyons, J. Haselgrove, A.M. Kelly, and N.A. Rubinstein. 1983. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett* 156:335-9.
- Garcia-Atares, N., I. San Jose, R. Cabo, J.A. Vega, and J. Represa. 1998. Changes in the cerebellar cortex of hairless Rhino-J mice (hr-rh-j). *Neurosci Lett* 256:13-6.
- Gauthier, K., D. Aubert, O. Chassande, F. Flamant, and J. Samarut. 2002. Null mutant mice for thyroid hormone receptors. *Methods Mol Biol* 202:13-29.
- Gauthier, K., O. Chassande, M. Plateroti, J.P. Roux, C. Legrand, B. Pain, B. Rousset, R. Weiss, J. Trouillas, and J. Samarut. 1999. Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *Embo J* 18:623-31.
- Gauthier, K., M. Plateroti, C.B. Harvey, G.R. Williams, R.E. Weiss, S. Refetoff, J.F. Willott, V. Sundin, J.P. Roux, L. Malaval, M. Hara, J. Samarut, and O. Chassande. 2001. Genetic Analysis Reveals Different Functions for the Products of the Thyroid Hormone Receptor alpha Locus. *Mol Cell Biol* 21:4748-60.

- Gerke, P., T. Benzing, M. Hohne, A. Kispert, M. Frotscher, G. Walz, and O. Kretz. 2006. Neuronal expression and interaction with the synaptic protein CASK suggest a role for Neph1 and Neph2 in synaptogenesis. *J Comp Neurol* 498:466-75.
- Germain, D.L., A. Hernandez, M.J. Schneider, and V.A. Galton. 2005. Insights into the role of deiodinases from studies of genetically modified animals. *Thyroid* 15:905-16.
- Gevers, E.F., B.C. van der Eerden, M. Karperien, A.K. Raap, I.C. Robinson, and J.M. Wit. 2002. Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 17:1408-19.
- Ghorbel, M.T., I. Seugnet, N. Hadj-Sahraoui, P. Topilko, G. Levi, and B. Demeneix. 1999. Thyroid hormone effects on Krox-24 transcription in the post-natal mouse brain are developmentally regulated but are not correlated with mitosis. *Oncogene* 18:917-24.
- Gilbert, M.E., L. Sui, M.J. Walker, W. Anderson, S. Thomas, S.N. Smoller, J.P. Schon, S. Phani, and J.H. Goodman. 2007. Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology* 148:92-102.
- Glass, C.K., and M.G. Rosenfeld. 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121-41.
- Gloss, B., M.R. Sayen, S.U. Trost, W.F. Bluhm, M. Meyer, E.A. Swanson, S.J. Usala, and W.H. Dillmann. 1999. Altered cardiac phenotype in transgenic mice carrying the delta337 threonine thyroid hormone receptor beta mutant derived from the S family. *Endocrinology* 140:897-902.
- Gloss, B., G. Giannocco, E.A. Swanson, A.S. Moriscot, G. Chiellini, T. Scanlan, J.D. Baxter, and W.H. Dillmann. 2005. Different configurations of specific thyroid hormone response elements mediate opposite effects of T3 and GC1 on gene expression. *Endocrinology*.
- Gloss, B., S. Trost, W. Bluhm, E. Swanson, R. Clark, R. Winkfein, K. Janzen, W. Giles, O. Chassande, J. Samarut, and W. Dillmann. 2001. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology* 142:544-50.
- Gold, D.A., S.H. Baek, N.J. Schork, D.W. Rose, D.D. Larsen, B.D. Sachs, M.G. Rosenfeld, and B.A. Hamilton. 2003. RORalpha coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron* 40:1119-31.
- Golozoubova, V., H. Gullberg, A. Matthias, B. Cannon, B. Vennstrom, and J. Nedergaard. 2004. Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 18:384-401.
- Gomes, F.C., C.G. Maia, J.R. de Menezes, and V.M. Neto. 1999. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* 25:247-55.
- Gong, D.W., S. Bi, B.D. Weintraub, and M. Reitman. 1998. Rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene: multiple promoters, high levels in brown adipose tissue, and tissue-specific regulation by thyroid hormone. *DNA Cell Biol* 17:301-9.
- Gordon, J.T., D.M. Kaminski, C.B. Rozanov, and M.B. Dratman. 1999. Evidence that 3,3',5-triiodothyronine is concentrated in and delivered from the locus coeruleus to its noradrenergic targets via anterograde axonal transport. *Neuroscience* 93:943-54.
- Gothe, S., Z. Wang, L. Ng, J.M. Kindblom, A.C. Barros, C. Ohlsson, B. Vennstrom, and D. Forrest. 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* 13:1329-41.

- Goulart da Silva, F., G. Giannocco, M.F. Santos, and M.T. Nunes. 2006. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology* 147:5777-85.
- Gray, P.A., H. Fu, P. Luo, Q. Zhao, J. Yu, A. Ferrari, T. Tenzen, D.I. Yuk, E.F. Tsung, Z. Cai, J.A. Alberta, L.P. Cheng, Y. Liu, J.M. Stenman, M.T. Valerius, N. Billings, H.A. Kim, M.E. Greenberg, A.P. McMahon, D.H. Rowitch, C.D. Stiles, and Q. Ma. 2004. Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science* 306:2255-7.
- Green, S.T., and J.P. Ng. 1986. Hypothyroidism and anaemia. *Biomed Pharmacother* 40:326-31.
- Grover, G.J., K. Mellstrom, and J. Malm. 2007. Therapeutic Potential for Thyroid Hormone Receptor-beta Selective Agonists for Treating Obesity, Hyperlipidemia and Diabetes. *Curr Vasc Pharmacol* 5:141-54.
- Guadano-Ferraz, A., M.J. Obregon, D.L. St Germain, and J. Bernal. 1997a. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10391-6.
- Guadano-Ferraz, A., M.J. Escamez, E. Rausell, and J. Bernal. 1999. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J Neurosci* 19:3430-9.
- Guadano-Ferraz, A., M.J. Escamez, B. Morte, P. Vargiu, and J. Bernal. 1997b. Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 49:37-44.
- Guadano-Ferraz, A., R. Benavides-Piccione, C. Venero, C. Lancha, B. Vennstrom, C. Sandi, J. DeFelipe, and J. Bernal. 2003. Lack of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry* 8:30-8.
- Gullberg, H., M. Rudling, D. Forrest, B. Angelin, and B. Vennstrom. 2000. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Mol Endocrinol* 14:1739-49.
- Hadj-Sahraoui, N., I. Seugnet, M.T. Ghorbel, and B. Demeneix. 2000. Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neurosci Lett* 280:79-82.
- Hartong, R., N. Wang, R. Kurokawa, M.A. Lazar, C.K. Glass, J.W. Apriletti, and W.H. Dillmann. 1994. Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1. *J Biol Chem* 269:13021-9.
- Harvey, C.B., J.H. Bassett, P. Maruvada, P.M. Yen, and G.R. Williams. 2007. The Rat Thyroid Hormone Receptor (TR) $\{\Delta\}\{\beta\}_3$ Displays Cell-, TR Isoform-, and Thyroid Hormone Response Element-Specific Actions. *Endocrinology* 148:1764-73.
- Hase, H., T. Ando, L. Eldeiry, A. Brebene, Y. Peng, L. Liu, H. Amano, T.F. Davies, L. Sun, M. Zaidi, and E. Abe. 2006. TNF α mediates the skeletal effects of thyroid-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12849-54.
- Hashimoto, K., M. Yamada, S. Matsumoto, T. Monden, T. Satoh, and M. Mori. 2006a. Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* 147:4292-302.

- Hashimoto, K., F.H. Curti, P.P. Borges, C.E. Lee, E.D. Abel, J.K. Elmquist, R.N. Cohen, and F.E. Wondisford. 2001a. An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 98:3998-4003.
- Hashimoto, K., F.H. Curti, P.P. Borges, C.E. Lee, E.D. Abel, J.K. Elmquist, R.N. Cohen, and F.E. Wondisford. 2001b. An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3998-4003.
- Hashimoto, K., R.N. Cohen, M. Yamada, K.R. Markan, T. Monden, T. Satoh, M. Mori, and F.E. Wondisford. 2006b. Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model. *J Biol Chem* 281:295-302.
- Havis, E., L.M. Sachs, and B.A. Demeneix. 2003. Metamorphic T3-response genes have specific co-regulator requirements. *EMBO Rep* 4:883-8.
- Havis, E., S. Le Mevel, G. Morvan Dubois, D.L. Shi, T.S. Scanlan, B.A. Demeneix, and L.M. Sachs. 2006. Unliganded thyroid hormone receptor is essential for *Xenopus laevis* eye development. *Embo J* 25:4943-51.
- Hayashi, S., and A.P. McMahon. 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244:305-18.
- Heisenberg, C.P., H. Thoenen, and D. Lindholm. 1992. Tri-iodothyronine regulates survival and differentiation of rat cerebellar granule neurons. *Neuroreport* 3:685-8.
- Heldt, S.A., L. Stanek, J.P. Chhatwal, and K.J. Ressler. 2007. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry*.
- Hendrich, C.E., and S.P. Porterfield. 1996. Ribosomal protein synthesis in 16 and 19 day gestation fetuses of hypothyroid mothers. *Proc Soc Exp Biol Med* 213:273-80.
- Hennemann, G. 2005. Notes on the history of cellular uptake and deiodination of thyroid hormone. *Thyroid* 15:753-6.
- Henning, S.J., D.C. Rubin, and J. Shulman. 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In : Johnson L.R., ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd ed. New York : Raven, 571-601.
- Hernandez, A., S. Fiering, E. Martinez, V.A. Galton, and D. St Germain. 2002. The gene locus encoding iodothyronine deiodinase type 3 (dio3) is imprinted in the fetus and expresses antisense transcripts. *Endocrinology* 143:4483-6.
- Hernandez, A., M.E. Martinez, S. Fiering, V.A. Galton, and D. St Germain. 2006. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest* 116:476-84.
- Heuer, H., and C.A. Mason. 2003. Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *J Neurosci* 23:10604-12.
- Heuer, H., M.K. Maier, S. Iden, J. Mittag, E.C. Friesema, T.J. Visser, and K. Bauer. 2005. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146:1701-6.
- Heyland, A., and L.L. Moroz. 2005. Cross-kingdom hormonal signaling: an insight from thyroid hormone functions in marine larvae. *J Exp Biol* 208:4355-61.
- Heyland, A., A.M. Reitzel, and J. Hodin. 2004. Thyroid hormones determine developmental mode in sand dollars (Echinodermata: Echinoidea). *Evol Dev* 6:382-92.
- Heyland, A., J. Hodin, and A.M. Reitzel. 2005. Hormone signaling in evolution and development: a non-model system approach. *Bioessays* 27:64-75.

- Heyland, A., D.A. Price, M. Bodnarova-Buganova, and L.L. Moroz. 2006. Thyroid hormone metabolism and peroxidase function in two non-chordate animals. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306:551-66.
- Holsberger, D.R., and P.S. Cooke. 2005. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 322:133-40.
- Holsberger, D.R., S.E. Kiesewetter, and P.S. Cooke. 2005. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biol Reprod* 73:396-403.
- Holsberger, D.R., S. Jirawatnotai, H. Kiyokawa, and P.S. Cooke. 2003. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 144:3732-8.
- Honegger, P., and D. Lenoir. 1980. Triiodothyronine enhancement of neuronal differentiation in aggregating fetal rat brain cells cultured in a chemically defined medium. *Brain Res* 199:425-34.
- Horvath, T.L., C.H. Warden, M. Hajos, A. Lombardi, F. Goglia, and S. Diano. 1999. Brain uncoupling protein 2: uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers. *J Neurosci* 19:10417-27.
- Howard-Ashby, M., S.C. Materna, C.T. Brown, L. Chen, R.A. Cameron, and E.H. Davidson. 2006. Gene families encoding transcription factors expressed in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300:90-107.
- Hsieh, J.C., J.M. Sisk, P.W. Jurutka, C.A. Haussler, S.A. Slater, M.R. Haussler, and C.C. Thompson. 2003. Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling. *J Biol Chem* 278:38665-74.
- Huang, C., and H.C. Freake. 1998. Thyroid hormone regulates the acetyl-CoA carboxylase PI promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 249:704-8.
- Ibarrola, N., M. Mayer-Proschel, A. Rodriguez-Pena, and M. Noble. 1996. Evidence for the existence of at least two timing mechanisms that contribute to oligodendrocyte generation in vitro. *Dev Biol* 180:1-21.
- Imai, T., M. Jiang, P. Kastner, P. Chambon, and D. Metzger. 2001. Selective ablation of retinoid X receptor alpha in hepatocytes impairs their lifespan and regenerative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4581-6.
- Indra, A.K., X. Warot, J. Brocard, J.M. Bornert, J.H. Xiao, P. Chambon, and D. Metzger. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324-7.
- Iniguez, M.A., A. Rodriguez-Pena, N. Ibarrola, M. Aguilera, A. Munoz, and J. Bernal. 1993. Thyroid hormone regulation of RC3, a brain-specific gene encoding a protein kinase-C substrate. *Endocrinology* 133:467-73.
- Iniguez, M.A., L. De Lecea, A. Guadano-Ferraz, B. Morte, D. Gerendasy, J.G. Sutcliffe, and J. Bernal. 1996. Cell-specific effects of thyroid hormone on RC3/neurogranin expression in rat brain. *Endocrinology* 137:1032-41.
- Inukai, T., K. Takanashi, K. Takebayashi, Y. Fujiwara, K. Tayama, and Y. Takemura. 1999. Thyroid hormone modulates insulin-like growth factor-I(IGF-I) and IGF-binding protein-3, without mediation by growth hormone, in patients with autoimmune thyroid diseases. *Horm Metab Res* 31:576-9.
- Issemann, I., and S. Green. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-50.
- Itoh, Y., T. Esaki, M. Kaneshige, H. Suzuki, M. Cook, L. Sokoloff, S.Y. Cheng, and J. Nunez. 2001. Brain glucose utilization in mice with a targeted mutation in the thyroid hormone alpha or beta receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9913-8.

- Jansen, J., E.C. Friesema, C. Milici, and T.J. Visser. 2005. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15:757-68.
- Jansen, J., E.C. Friesema, M.H. Kester, C. Milici, M. Reeser, A. Gruters, T.G. Barrett, E.E. Mancilla, J. Svensson, J.L. Wemeau, M.H. da Silva Canalli, J. Lundgren, M.E. McEntagart, N. Hopper, W.F. Arts, and T.J. Visser. 2007. Functional analysis of MCT8 mutations identified in patients with X-linked psychomotor retardation and elevated serum triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Janssen, A., P. Gressens, M. Grabenbauer, E. Baumgart, A. Schad, I. Vanhorebeek, A. Brouwers, P.E. Declercq, D. Fahimi, P. Evrard, L. Schoonjans, D. Collen, P. Carmeliet, G. Mannaerts, P. Van Veldhoven, and M. Baes. 2003. Neuronal migration depends on intact peroxisomal function in brain and in extraneuronal tissues. *J Neurosci* 23:9732-41.
- Jenuwein, T., and C.D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-80.
- Jeyakumar, M., X.F. Liu, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and M.K. Bagchi. 2007. Phosphorylation of Thyroid Hormone Receptor-associated Nuclear Receptor Corepressor Holocomplex by the DNA-dependent Protein Kinase Enhances Its Histone Deacetylase Activity. *J Biol Chem* 282:9312-22.
- Jho, S.H., C. Vouthounis, B. Lee, O. Stojadinovic, M.J. Im, H. Brem, A. Merchant, K. Chau, and M. Tomic-Canic. 2005. The book of opposites: the role of the nuclear receptor co-regulators in the suppression of epidermal genes by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *J Invest Dermatol* 124:1034-43.
- Johansson, C., B. Vennstrom, and P. Thoren. 1998. Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor-alpha1- deficient mice is an intrinsic defect. *Am J Physiol* 275:R640-6.
- Johansson, C., J. Lannergren, P.K. Lunde, B. Vennstrom, P. Thoren, and H. Westerblad. 2000. Isometric force and endurance in soleus muscle of thyroid hormone receptor-alpha(1)- or -beta-deficient mice [In Process Citation]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R598-603.
- Johansson, L., M. Rudling, T.S. Scanlan, T. Lundasen, P. Webb, J. Baxter, B. Angelin, and P. Parini. 2005. Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10297-302.
- Jones, I., L. Ng, H. Liu, and D. Forrest. 2007. An intron control region differentially regulates expression of thyroid hormone receptor {beta}2 in the cochlea, pituitary and cone photoreceptors. *Mol Endocrinol*.
- Kahaly, G.J., and W.H. Dillmann. 2005. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev* 26:704-28.
- Kalaany, N.Y., K.C. Gauthier, A.M. Zavacki, P.P. Mammen, T. Kitazume, J.A. Peterson, J.D. Horton, D.J. Garry, A.C. Bianco, and D.J. Mangelsdorf. 2005. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab* 1:231-44.
- Kalderon, B., O. Hermesh, and J. Bar-Tana. 1995. Mitochondrial permeability transition is induced by in vivo thyroid hormone treatment. *Endocrinology* 136:3552-6.
- Kaneshige, M., H. Suzuki, K. Kaneshige, J. Cheng, H. Wimbrow, C. Barlow, M.C. Willingham, and S. Cheng Sy. 2001a. A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone alpha 1 receptor causes increased mortality, infertility, and dwarfism in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 4:4.
- Kaneshige, M., H. Suzuki, K. Kaneshige, J. Cheng, H. Wimbrow, C. Barlow, M.C. Willingham, and S. Cheng. 2001b. A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone alpha 1 receptor causes increased mortality, infertility, and dwarfism in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15095-100.

- Kaneshige, M., K. Kaneshige, X. Zhu, A. Dace, L. Garrett, T.A. Carter, R. Kazlauskaitė, D.G. Pankratz, A. Wynshaw-Boris, S. Refetoff, B. Weintraub, M.C. Willingham, C. Barlow, and S. Cheng. 2000. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kang, S.M., M.S. Cho, H. Seo, C.J. Yoon, S.K. Oh, Y.M. Choi, and D.W. Kim. 2007. Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:419-24.
- Kaplan, M.M. 1984. The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function. *Neuroendocrinology* 38:254-60.
- Kato, H., T. Fukuda, C. Parkison, P. McPhie, and S.Y. Cheng. 1989. Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7861-5.
- Kato, Y., H. Ying, L. Zhao, F. Furuya, O. Araki, M.C. Willingham, and S.Y. Cheng. 2006. PPARgamma insufficiency promotes follicular thyroid carcinogenesis via activation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 25:2736-47.
- Kawai, K., S. Sasaki, H. Morita, T. Ito, S. Suzuki, H. Misawa, and H. Nakamura. 2004. Unliganded thyroid hormone receptor-beta1 represses liver X receptor alpha/oxysterol-dependent transactivation. *Endocrinology* 145:5515-24.
- Kellendonk, C., C. Opherke, K. Anlag, G. Schutz, and F. Tronche. 2000. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* 26:151-3.
- Kendall, S.K., L.C. Samuelson, T.L. Saunders, R.I. Wood, and S.A. Camper. 1995. Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes Dev* 9:2007-19.
- Kenessey, A., and K. Ojamaa. 2005. Ligand-mediated decrease of thyroid hormone receptor-alpha1 in cardiomyocytes by proteasome-dependent degradation and altered mRNA stability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H813-21.
- Kim, P.S., S.A. Hossain, Y.N. Park, I. Lee, S.E. Yoo, and P. Arvan. 1998. A single amino acid change in the acetylcholinesterase-like domain of thyroglobulin causes congenital goiter with hypothyroidism in the cog/cog mouse: a model of human endoplasmic reticulum storage diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9909-13.
- Kimura, S., Y. Hara, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, C.H. Fox, J.M. Ward, and F.J. Gonzalez. 1996. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 10:60-9.
- Kindblom, J.M., S. Gothe, D. Forrest, J. Tornell, J. Tornell, B. Vennstrom, and C. Ohlsson. 2001. GH substitution reverses the growth phenotype but not the defective ossification in thyroid hormone receptor alpha 1-/-beta-/- mice. *J Endocrinol* 171:15-22.
- Kindblom, J.M., E.F. Gevers, S.M. Skrtic, M.K. Lindberg, S. Gothe, J. Tornell, B. Vennstrom, and C. Ohlsson. 2005. Increased adipogenesis in bone marrow but decreased bone mineral density in mice devoid of thyroid hormone receptors. *Bone* 36:607-16.
- King-Jones, K., and C.S. Thummel. 2005. Nuclear receptors--a perspective from Drosophila. *Nat Rev Genet* 6:311-23.
- Kluge, B., N. Renault, and K.B. Rohr. 2005. Anatomical and molecular reinvestigation of lamprey endostyle development provides new insight into thyroid gland evolution. *Dev Genes Evol* 215:32-40.
- Ko, L., G.R. Cardona, T. Iwasaki, K.S. Bramlett, T.P. Burris, and W.W. Chin. 2002. Ser-884 adjacent to the LXXLL motif of coactivator TRBP defines selectivity for ERs and TRs. *Mol Endocrinol* 16:128-40.

- Koibuchi, N., and W.W. Chin. 1998. ROR alpha gene expression in the perinatal rat cerebellum: ontogeny and thyroid hormone regulation. *Endocrinology* 139:2335-41.
- Koibuchi, N., and W.W. Chin. 2000. Thyroid Hormone Action and Brain Development. *Trends Endocrinol Metab* 11:123-128.
- Koibuchi, N., H. Fukuda, and W.W. Chin. 1999. Promoter-specific regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene by thyroid hormone in the developing rat cerebellum. *Endocrinology* 140:3955-61.
- Koibuchi, N., S. Yamaoka, and W.W. Chin. 2001. Effect of altered thyroid status on neurotrophin gene expression during postnatal development of the mouse cerebellum. *Thyroid* 11:205-10.
- Koller, K.J., R.S. Wolff, M.K. Warden, and R.T. Zoeller. 1987. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7329-33.
- Koo, J., S. Shim, C. Gu, O. Yoo, and S. Park. 2003. Identification of an enhancer region in the mouse ephA8 locus directing expression to the anterior region of the dorsal mesencephalon. *Dev Dyn* 226:596-603.
- Krauss, S., C.Y. Zhang, and B.B. Lowell. 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-61.
- Krysko, O., L. Hulshagen, A. Janssen, G. Schutz, R. Klein, M. De Bruycker, M. Espeel, P. Gressens, and M. Baes. 2007. Neocortical and cerebellar developmental abnormalities in conditions of selective elimination of peroxisomes from brain or from liver. *J Neurosci Res* 85:58-72.
- Kurokawa, R., J. DiRenzo, M. Boehm, J. Sugarman, B. Gloss, M.G. Rosenfeld, R.A. Heyman, and C.K. Glass. 1994. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* 371:528-31.
- Lanni, A., M. Moreno, A. Lombardi, P. de Lange, E. Silvestri, M. Ragni, P. Farina, G.C. Baccari, P. Fallahi, A. Antonelli, and F. Goglia. 2005. 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *Faseb J* 19:1552-4.
- Lauder, J.M. 1977. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. III Kinetics of cell proliferation in the external granular layer. *Brain Research* 126:31-51.
- Laudet, V. 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19:207-26.
- Laurberg, P. 1984. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism* 33:379-92.
- Lavado-Autric, R., E. Auso, J.V. Garcia-Velasco, C. Arufe Mdel, F. Escobar del Rey, P. Berbel, and G. Morreale de Escobar. 2003. Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J Clin Invest* 111:1073-82.
- Lazar, M.A., R.A. Hodin, and W.W. Chin. 1989. Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-erbA inhibits trans- activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7771-4.
- Le Bouter, S., S. Demolombe, A. Chambellan, C. Bellocq, F. Aimond, G. Toumaniantz, G. Lande, S. Siavoshian, I. Baro, A.L. Pond, J.M. Nerbonne, J.J. Leger, D. Escande, and F. Charpentier. 2003. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ Res* 92:234-42.
- Lechan, R.M., Y. Qi, T.J. Berrodin, K.D. Davis, H.L. Schwartz, K.A. Strait, J.H. Oppenheimer, and M.A. Lazar. 1993. Immunocytochemical delineation of thyroid

- hormone receptor beta 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Endocrinology* 132:2461-9.
- Lecureuil, C., I. Fontaine, P. Crepieux, and F. Guillou. 2002. Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* 33:114-8.
- Lee, S., and M.L. Privalsky. 2005. Multiple mutations contribute to repression by the v-Erb A oncoprotein. *Oncogene* 24:6737-52.
- Lefstin, J.A., and K.R. Yamamoto. 1998. Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392:885-8.
- Legrand, J. 1982. [Thyroid hormones and maturation of the nervous system]. *J Physiol* 78:603-52.
- Legrand, J. 1986. Thyroid hormone effects on growth and development. *Thyroid Hormone Metabolism*, ed Hennemann, 503-534.
- Lemkine, G.F., A. Raj, G. Alfama, N. Turque, Z. Hassani, O. Alegria-Prevot, J. Samarut, G. Levi, and B.A. Demeneix. 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *Faseb J* 19:863-5.
- Leo, C., and J.D. Chen. 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245:1-11.
- Leonard, J.L., C.A. Siegrist-Kaiser, and C.J. Zuckerman. 1990. Regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase by thyroid hormone. Inhibition of actin polymerization blocks enzyme inactivation in cAMP-stimulated glial cells. *J Biol Chem* 265:940-6.
- Lewis, P.M., A. Gritli-Linde, R. Smeyne, A. Kottmann, and A.P. McMahon. 2004. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 270:393-410.
- Li, D., T. Yamada, F. Wang, A.I. Vulin, and H.H. Samuels. 2004. Novel roles of retinoid X receptor (RXR) and RXR ligand in dynamically modulating the activity of the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *J Biol Chem* 279:7427-37.
- Li, J., Q. Lin, H.G. Yoon, Z.Q. Huang, B.D. Strahl, C.D. Allis, and J. Wong. 2002. Involvement of histone methylation and phosphorylation in regulation of transcription by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* 22:5688-97.
- Li, S., E.B. Crenshaw, 3rd, E.J. Rawson, D.M. Simmons, L.W. Swanson, and M.G. Rosenfeld. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347:528-33.
- Li, X., J. Wong, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley. 2003. Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol* 23:3763-73.
- Lin-Lee, Y.C., W. Strobl, S. Soyak, M. Radosavljevic, M. Song, A.M. Gotto, Jr., and W. Patsch. 1993. Role of thyroid hormone in the expression of apolipoprotein A-IV and C-III genes in rat liver. *J Lipid Res* 34:249-59.
- Lin, H.Y., R. Hopkins, H.J. Cao, H.Y. Tang, C. Alexander, F.B. Davis, and P.J. Davis. 2005. Acetylation of nuclear hormone receptor superfamily members: thyroid hormone causes acetylation of its own receptor by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Steroids* 70:444-9.
- Liu, Y., X. Xia, J.D. Fondell, and P.M. Yen. 2006a. Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of co-activator recruitment and histone acetylation. *Mol Endocrinol* 20:483-90.
- Liu, Y.W., L.J. Lo, and W.K. Chan. 2000. Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors alpha1 and beta1 during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*. *Mol Cell Endocrinol* 159:187-95.

- Liu, Y.Y., J.J. Schultz, and G.A. Brent. 2003. A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J Biol Chem* 278:38913-20.
- Liu, Y.Y., R.S. Heymann, F. Moatamed, J.J. Schultz, D. Sobel, and G.A. Brent. 2006b. A Mutant Thyroid Hormone Receptor {alpha} Antagonizes PPAR{alpha}-Signaling In Vivo and Impairs Fatty Acid Oxidation. *Endocrinology*.
- Liu, Y.Y., R.S. Heymann, F. Moatamed, J.J. Schultz, D. Sobel, and G.A. Brent. 2007. A Mutant Thyroid Hormone Receptor {alpha} Antagonizes Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {alpha} Signaling in Vivo and Impairs Fatty Acid Oxidation. *Endocrinology* 148:1206-17.
- Loinder, K., and M. Soderstrom. 2004. Functional analyses of an LXXLL motif in nuclear receptor corepressor (N-CoR). *J Steroid Biochem Mol Biol* 91:191-6.
- Lu, N.Z., and J.A. Cidlowski. 2006. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16:301-7.
- Lutz, M., L.J. Burke, P. LeFevre, F.A. Myers, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson, C. Bonifer, G.N. Filippova, V. Lobanenko, and R. Renkawitz. 2003. Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor. *Embo J* 22:1579-87.
- Macchia, P.E., M.D. Felice, and R.D. Lauro. 1999. Molecular genetics of congenital hypothyroidism. *Curr Opin Genet Dev* 9:289-294.
- Macchia, P.E., Y. Takeuchi, T. Kawai, K. Cua, K. Gauthier, O. Chassande, H. Seo, Y. Hayashi, J. Samarut, Y. Murata, R.E. Weiss, and S. Refetoff. 2001. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:349-354.
- Maden, M. 2002. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3:843-53.
- Malbon, C.C., H.R. Gilman, and J.N. Fain. 1980. Hormonal stimulation of cyclic AMP accumulation and glycogen phosphorylase activity in calcium-depleted hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. *Biochem J* 188:593-9.
- Mansen, A., F. Yu, D. Forrest, L. Larsson, and B. Vennstrom. 2001. TRs have common and isoform-specific functions in regulation of the cardiac myosin heavy chain genes. *Mol Endocrinol* 15:2106-14.
- Mansouri, A., K. Chowdhury, and P. Gruss. 1998. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 19:87-90.
- Manzon, R.G., J.G. Eales, and J.H. Youson. 1998. Blocking of KC104-induced metamorphosis in premetamorphic sea lampreys by exogenous thyroid hormones (TH); effects of KC104 and TH on serum TH concentrations and intestinal thyroxine outer-ring deiodination. *Gen Comp Endocrinol* 112:54-62.
- Marchand, O., R. Safi, H. Escriva, E. Van Rompaey, P. Prunet, and V. Laudet. 2001. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J Mol Endocrinol* 26:51-65.
- Mariash, C.N., and J.H. Oppenheimer. 1983. Interrelationship of triiodothyronine concentration, metabolism, protein binding, and nuclear occupancy in the induction of malic enzyme by cultured adult rat hepatocytes. *Endocrinology* 112:80-5.
- Marimuthu, A., W. Feng, T. Tagami, H. Nguyen, J.L. Jameson, R.J. Fletterick, J.D. Baxter, and B.L. West. 2002. TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* 16:271-86.
- Marrif, H., A. Schiffman, Z. Stepanyan, M.A. Gillis, A. Calderone, R.E. Weiss, J. Samarut, and J.E. Silva. 2005. Temperature Homeostasis in transgenic mice lacking thyroid hormone receptor alpha gene products. *Endocrinology*.

- Marsh-Armstrong, N., H. Huang, B.F. Remo, T.T. Liu, and D.D. Brown. 1999a. Asymmetric growth and development of the *Xenopus laevis* retina during metamorphosis is controlled by type III deiodinase. *Neuron* 24:871-8.
- Marsh-Armstrong, N., H. Huang, B.F. Remo, T.T. Liu, and D.D. Brown. 1999b. Asymmetric growth and development of the *Xenopus laevis* retina during metamorphosis is controlled by type III deiodinase. *Neuron* 24:871-8.
- Martinez, L., M.T. Sonoda, P. Webb, J.D. Baxter, M.S. Skaf, and I. Polikarpov. 2005. Molecular dynamics simulations reveal multiple pathways of ligand dissociation from thyroid hormone receptors. *Biophys J* 89:2011-23.
- Martinez, R., and F.C. Gomes. 2002. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 277:49311-8.
- Martinez, R., and F.C. Gomes. 2005. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway. *J Neurosci Res* 80:341-9.
- Maruvada, P., C.T. Baumann, G.L. Hager, and P.M. Yen. 2003. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 278:12425-32.
- Mason, G.A., C.H. Walker, and A.J. Prange, Jr. 1993. L-triiodothyronine: is this peripheral hormone a central neurotransmitter? *Neuropsychopharmacology* 8:253-8.
- Mata De Urquiza, A., L. Solomin, and T. Perlmann. 1999. Feedback-inducible nuclear-receptor-driven reporter gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13270-5.
- Mathis, C., L. Collin, and E. Borrelli. 2003. Oligodendrocyte ablation impairs cerebellum development. *Development* 130:4709-18.
- Matsushita, A., S. Sasaki, Y. Kashiwabara, K. Nagayama, K. Ohba, H. Iwaki, H. Misawa, K. Ishizuka, and H. Nakamura. 2007. Essential role of GATA2 in the negative regulation of thyrotropin {beta} gene by thyroid hormone and its receptors. *Mol Endocrinol*.
- Mendis-Handagama, S.M., and H.B. Ariyaratne. 2004. Effects of thyroid hormones on Leydig cells in the postnatal testis. *Histol Histopathol* 19:985-97.
- Mengeling, B.J., F. Pan, and M.L. Privalsky. 2005. Novel mode of deoxyribonucleic acid recognition by thyroid hormone receptors: thyroid hormone receptor beta-isoforms can bind as trimers to natural response elements comprised of reiterated half-sites. *Mol Endocrinol* 19:35-51.
- Metivier, R., G. Penot, M.R. Hubner, G. Reid, H. Brand, M. Kos, and F. Gannon. 2003. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751-63.
- Metzger, D., and R. Feil. 1999. Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 10:470-6.
- Metzger, E., M. Wissmann, N. Yin, J.M. Muller, R. Schneider, A.H. Peters, T. Gunther, R. Buettner, and R. Schule. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437:436-9.
- Miller, L.D., P. McPhie, H. Suzuki, Y. Kato, E.T. Liu, and S.Y. Cheng. 2004. Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance. *Genome Biol* 5:R31.
- Miniou, P., D. Tiziano, T. Frugier, N. Roblot, M. Le Meur, and J. Melki. 1999. Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res* 27:e27.

- Mittag, J., E. Winterhager, K. Bauer, and R. Grummer. 2007. Congenital hypothyroid female pax8-deficient mice are infertile despite thyroid hormone replacement therapy. *Endocrinology* 148:719-25.
- Mittag, J., S. Friedrichsen, H. Heuer, S. Polsfuss, T.J. Visser, and K. Bauer. 2005. Athyroid Pax8^{-/-} Mice Cannot Be Rescued by the Inactivation of Thyroid Hormone Receptor {alpha}1. *Endocrinology* 146:3179-84.
- Moeller, L.C., A.M. Dumitrescu, and S. Refetoff. 2005a. Cytosolic Action of Thyroid Hormone Leads to Induction of HIF-1{alpha} and Glycolytic Genes. *Mol Endocrinol* 19:2955-63.
- Moeller, L.C., A.M. Dumitrescu, R.L. Walker, P.S. Meltzer, and S. Refetoff. 2005b. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 90:936-43.
- Montero-Pedrazuela, A., C. Venero, R. Lavado-Autric, I. Fernandez-Lamo, J.M. Garcia-Verdugo, J. Bernal, and A. Guadano-Ferraz. 2006. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* 11:361-71.
- Moore, J.M., S.J. Galicia, A.C. McReynolds, N.H. Nguyen, T.S. Scanlan, and R.K. Guy. 2004. Quantitative proteomics of the thyroid hormone receptor-coregulator interactions. *J Biol Chem* 279:27584-90.
- Moraitis, A.N., V. Giguere, and C.C. Thompson. 2002. Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol* 22:6831-41.
- Morgan, M.A., T.L. Dellovade, and D.W. Pfaff. 2000. Effect of thyroid hormone administration on estrogen-induced sex behavior in female mice. *Horm Behav* 37:15-22.
- Morkin, E. 1993. Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. *Circulation* 87:1451-60.
- Moroz, L.L., J.R. Edwards, S.V. Puthanveetil, A.B. Kohn, T. Ha, A. Heyland, B. Knudsen, A. Sahni, F. Yu, L. Liu, S. Jezzini, P. Lovell, W. Iannuccilli, M. Chen, T. Nguyen, H. Sheng, R. Shaw, S. Kalachikov, Y.V. Panchin, W. Farmerie, J.J. Russo, J. Ju, and E.R. Kandel. 2006. Neuronal transcriptome of aplysia: neuronal compartments and circuitry. *Cell* 127:1453-67.
- Morreale de Escobar, G., R. Pastor, M.J. Obregon, and F. Escobar del Rey. 1985. Effect of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 117:1890-1900.
- Morrish, F., N.E. Buroker, M. Ge, X.H. Ning, J. Lopez-Guisa, D. Hockenbery, and M.A. Portman. 2006. Thyroid hormone receptor isoforms localize to cardiac mitochondrial matrix with potential for binding to receptor elements on mtDNA. *Mitochondrion* 6:143-8.
- Morte, B., M.A. Iniguez, P.I. Lorenzo, and J. Bernal. 1997. Thyroid hormone-regulated expression of RC3/neurogranin in the immortalized hypothalamic cell line GT1-7. *J Neurochem* 69:902-9.
- Morte, B., J. Manzano, T. Scanlan, B. Vennstrom, and J. Bernal. 2002. Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3985-9.
- Morvan Dubois, G., A. Sebillot, G.G. Kuiper, C.H. Verhoelst, V.M. Darras, T.J. Visser, and B.A. Demeneix. 2006. Deiodinase activity is present in *Xenopus laevis* during early embryogenesis. *Endocrinology* 147:4941-9.

- Mukhi, S., L. Torres, and R. Patino. 2007. Effects of larval-juvenile treatment with perchlorate and co-treatment with thyroxine on zebrafish sex ratios. *Gen Comp Endocrinol* 150:486-94.
- Muller, M.J., and H.J. Seitz. 1980. Rapid and direct stimulation of hepatic gluconeogenesis by L-triiodothyronine (T3) in the isolated-perfused rat liver. *Life Sci* 27:827-35.
- Muller, Y., E. Rocchi, J.B. Lazaro, and J. Clos. 1995. Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *Int J Dev Neurosci* 13:871-85.
- Munoz, A., A. Rodriguez-Pena, A. Perez-Castillo, B. Ferreiro, J.G. Sutcliffe, and J. Bernal. 1991. Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. *Mol Endocrinol* 5:273-80.
- Nakanishi, T. 2007. The problem of species comparison of developmental toxicity: can we extrapolate human developmental toxicity induced by environmental chemicals from the data of rodents? *Yakugaku Zasshi* 127:491-500.
- Nakano, K., A. Matsushita, S. Sasaki, H. Misawa, K. Nishiyama, Y. Kashiwabara, and H. Nakamura. 2004. Thyroid-hormone-dependent negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells. *Biochem J* 378:549-57.
- Nanto-Salonen, K., G.F. Glasscock, and R.G. Rosenfeld. 1991. The effects of thyroid hormone on insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) expression in the neonatal rat: prolonged high expression of IGFBP-2 in methimazole-induced congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 129:2563-70.
- Nelson, E.R., and H.R. Habibi. 2006. Molecular characterization and sex-related seasonal expression of thyroid receptor subtypes in goldfish. *Mol Cell Endocrinol* 253:83-95.
- Ness, G.C., and L.C. Pendleton. 1991. Thyroid hormone increases glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene expression in rat liver. *FEBS Lett* 288:21-2.
- Ness, G.C., L.C. Pendleton, Y.C. Li, and J.Y. Chiang. 1990. Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 alpha hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1150-6.
- Neveu, I., and E. Arenas. 1996. Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo. *J Cell Biol* 133:631-46.
- Newell, F.W., and K.R. Diddle. 1977. Typical monochromacy, congenital deafness, and resistance to intracellular action of thyroid hormone. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 171:731-734.
- Ng, L., A. Rusch, L.L. Amma, K. Nordstrom, L.C. Erway, B. Vennstrom, and D. Forrest. 2001a. Suppression of the deafness and thyroid dysfunction in *Thrb*-null mice by an independent mutation in the *Thra* thyroid hormone receptor alpha gene. *Hum Mol Genet* 10:2701-2708.
- Ng, L., J.B. Hurley, B. Dierks, M. Srinivas, C. Salto, B. Vennstrom, T.A. Reh, and D. Forrest. 2001b. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 27:94-8.
- Nguyen, N.H., J.W. Apriletti, S.T. Cunha Lima, P. Webb, J.D. Baxter, and T.S. Scanlan. 2002. Rational design and synthesis of a novel thyroid hormone antagonist that blocks coactivator recruitment. *J Med Chem* 45:3310-20.
- Nicholson, J.L., and J. Altman. 1972. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res* 44:25-36.

- Nicoll, J.B., B.L. Gwinn, J.S. Iwig, P.P. Garcia, C.F. Bunn, and L.A. Allison. 2003. Compartment-specific phosphorylation of rat thyroid hormone receptor $\alpha 1$ regulates nuclear localization and retention. *Mol Cell Endocrinol* 205:65-77.
- Niederreither, K., J. Vermot, V. Fraulob, P. Chambon, and P. Dolle. 2002. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)- independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16111-6.
- Nikrodhanond, A.A., T.M. Ortiga-Carvalho, N. Shibusawa, K. Hashimoto, X.H. Liao, S. Refetoff, M. Yamada, M. Mori, and F.E. Wondisford. 2006. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem* 281:5000-7.
- Nishiyama, K., S. Baba, T. Yamada, A. Matsushita, H. Natsume, K. Nakano, S. Sasaki, and H. Nakamura. 2003. Embryonic lethal effect of expressing a dominant negative mutant human thyroid hormone receptor $\alpha 1$ in mice. *Endocr J* 50:561-70.
- O'Shea, P.J., J.H. Bassett, S. Sriskantharajah, H. Ying, S.Y. Cheng, and G.R. Williams. 2005. Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormone receptor $\alpha 1$ or β . *Mol Endocrinol* 19:3045-59.
- O'Shea, P.J., C.B. Harvey, H. Suzuki, M. Kaneshige, K. Kaneshige, S.Y. Cheng, and G.R. Williams. 2003. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 17:1410-24.
- Obregon, M.J., J. Mallol, R. Pastor, G. Morreale de Escobar, and F. Escobar del Rey. 1984. L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 114:305-7.
- Ohlsson, C., A. Nilsson, O. Isaksson, J. Bentham, and A. Lindahl. 1992. Effects of triiodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *J Endocrinol* 135:115-23.
- Olateju, T.O., and M.P. Vanderpump. 2006. Thyroid hormone resistance. *Ann Clin Biochem* 43:431-40.
- Oppenheimer, J.H., and H.L. Schwartz. 1997. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* 18:462-75.
- Oppenheimer, J.H., H.L. Schwartz, and M.I. Surks. 1972. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *J Clin Invest* 51:2493-7.
- Ortiga-Carvalho, T.M., N. Shibusawa, A. Nikrodhanond, K.J. Oliveira, D.S. Machado, X.H. Liao, R.N. Cohen, S. Refetoff, and F.E. Wondisford. 2005. Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *J Clin Invest* 115:2517-2523.
- Osborn, D., and R. Hunt. 2007. Prophylactic postnatal thyroid hormones for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD005948.
- Owen, G.I., and A. Zelent. 2000. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci* 57:809-27.
- Palmero, S., M. de Marchis, G. Gallo, and E. Fugassa. 1989. Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. *J Endocrinol* 123:105-11.
- Park, S.W., G. Li, Y.P. Lin, M.J. Barrero, K. Ge, R.G. Roeder, and L.N. Wei. 2005. Thyroid hormone-induced juxtaposition of regulatory elements/factors and chromatin remodeling of *Crabp1* dependent on MED1/TRAP220. *Mol Cell* 19:643-53.
- Paul, B.D., L. Fu, D.R. Buchholz, and Y.B. Shi. 2005. Coactivator recruitment is essential for liganded thyroid hormone receptor to initiate amphibian metamorphosis. *Mol Cell Biol* 25:5712-24.

- Pedraza, P.E., M.J. Obregon, H.F. Escobar-Morreale, F.E. del Rey, and G.M. de Escobar. 2006. Mechanisms of adaptation to iodine deficiency in rats: thyroid status is tissue specific. Its relevance for man. *Endocrinology* 147:2098-108.
- Peet, D.J., S.D. Turley, W. Ma, B.A. Janowski, J.M. Lobaccaro, R.E. Hammer, and D.J. Mangelsdorf. 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693-704.
- Perez-Juste, G., S. Garcia-Silva, and A. Aranda. 2000. An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 275:1307-14.
- Phelps, C., V. Gburcik, E. Suslova, P. Dudek, F. Forafonov, N. Bot, M. MacLean, R.J. Fagan, and D. Picard. 2006. Fungi and animals may share a common ancestor to nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7077-81.
- Pinna, G., O. Brodel, T. Visser, A. Jeitner, H. Grau, M. Eravci, H. Meinhold, and A. Baumgartner. 2002. Concentrations of seven iodothyronine metabolites in brain regions and the liver of the adult rat. *Endocrinology* 143:1789-800.
- Pizzagalli, F., B. Hagenbuch, B. Stieger, U. Klenk, G. Folkers, and P.J. Meier. 2002. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol* 16:2283-96.
- Plateroti, M., E. Kress, J.I. Mori, and J. Samarut. 2006. Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 26:3204-14.
- Plateroti, M., K. Gauthier, C. Domon-Dell, J.N. Freund, J. Samarut, and O. Chassande. 2001. Functional Interference between Thyroid Hormone Receptor alpha (TRalpha) and Natural Truncated TRDeltaalpha Isoforms in the Control of Intestine Development. *Mol Cell Biol* 21:4761-72.
- Poguet, A.L., C. Legrand, X. Feng, P.M. Yen, P. Meltzer, J. Samarut, and F. Flamant. 2003. Microarray analysis of knockout mice identifies cyclin D2 as a possible mediator for the action of thyroid hormone during the postnatal development of the cerebellum. *Dev Biol* 254:188-99.
- Poleev, A., H. Fickenscher, S. Mundlos, A. Winterpacht, B. Zabel, A. Fidler, P. Gruss, and D. Plachov. 1992. PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development* 116:611-23.
- Poliakov, A., M. Cotrina, and D.G. Wilkinson. 2004. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* 7:465-80.
- Polly, P., M. Herdick, U. Moehren, A. Baniahmad, T. Heinzel, and C. Carlberg. 2000. VDR-Alien: a novel, DNA-selective vitamin D(3) receptor-corepressor partnership. *Faseb J* 14:1455-63.
- Potter, G.B., F. Facchinetti, G.M. Beaudoin, 3rd, and C.C. Thompson. 2001a. Neuronal expression of synaptotagmin-related gene 1 is regulated by thyroid hormone during cerebellar development. *J Neurosci* 21:4373-80.
- Potter, G.B., J.M. Zarach, J.M. Sisk, and C.C. Thompson. 2002. The thyroid hormone-regulated corepressor hairless associates with histone deacetylases in neonatal rat brain. *Mol Endocrinol* 16:2547-60.
- Potter, G.B., G.M. Beaudoin, 3rd, C.L. DeRenzo, J.M. Zarach, S.H. Chen, and C.C. Thompson. 2001b. The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev* 15:2687-701.
- Power, D.M., L. Llewellyn, M. Faustino, M.A. Nowell, B.T. Bjornsson, I.E. Einarsdottir, A.V. Canario, and G.E. Sweeney. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130:447-59.

- Puzianowska-Kuznicka, M., M. Pietrzak, O. Turowska, and A. Nauman. 2006. Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation. *Acta Biochim Pol* 53:641-50.
- Qiu, C.H., N. Shimokawa, T. Iwasaki, I.S. Parhar, and N. Koibuchi. 2007. Alteration of cerebellar neurotrophin mRNAs and the lack of TR augmentation by staggerer type ROR{ α } mutation. *Endocrinology*.
- Ramos, H.E., and R.E. Weiss. 2006. Regulation of nuclear coactivator and corepressor expression in mouse cerebellum by thyroid hormone. *Thyroid* 16:211-6.
- Rastinejad, F., T. Perlmann, R.M. Evans, and P.B. Sigler. 1995. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375:203-11.
- Refetoff, S. 1996. Resistance in Thyroid Hormone. in *The Thyroid*, Eds L.E. Braverman and R.D. Utiger. Lippincott-Raven Press, Philadelphia- New-York.
- Reitman, M.L., Y. He, and D.W. Gong. 1999. Thyroid hormone and other regulators of uncoupling proteins. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 6:S56-9.
- Revel, F.G., M. Saboureau, P. Pevet, J.D. Mikkelsen, and V. Simonneaux. 2006. Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology* 147:4680-7.
- Ribeiro, M.O., S.D. Carvalho, J.J. Schultz, G. Chiellini, T.S. Scanlan, A.C. Bianco, and G.A. Brent. 2001. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest* 108:97-105.
- Roberts, C.G., and P.W. Ladenson. 2004. Hypothyroidism. *Lancet* 363:793-803.
- Roberts, M.R., M. Srinivas, D. Forrest, G. Morreale de Escobar, and T.A. Reh. 2006. Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6218-23.
- Robinson-Rechavi, M., C.V. Maina, C.R. Gissendanner, V. Laudet, and A. Sluder. 2005. Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes. *J Mol Evol* 60:577-86.
- Robson, H., T. Siebler, D.A. Stevens, S.M. Shalet, and G.R. Williams. 2000. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation [In Process Citation]. *Endocrinology* 141:3887-97.
- Rocha, A.S., R. Marques, I. Bento, R. Soares, J. Magalhaes, I.V. de Castro, and P. Soares. 2007. Thyroid hormone receptor beta mutations in the 'hot-spot region' are rare events in thyroid carcinomas. *J Endocrinol* 192:83-6.
- Rochon, C., I. Tauveron, C. Dejax, P. Benoit, P. Capitan, A. Fabricio, C. Berry, C. Champredon, P. Thieblot, and J. Grizard. 2003. Response of glucose disposal to hyperinsulinaemia in human hypothyroidism and hyperthyroidism. *Clin Sci (Lond)* 104:7-15.
- Rodriguez-Pena, A., N. Ibarrola, M.A. Iniguez, A. Munoz, and J. Bernal. 1993. Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. *J Clin Invest* 91:812-8.
- Rogatsky, I., H.F. Luecke, D.C. Leitman, and K.R. Yamamoto. 2002. Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16701-6.
- Romero, R., B. Casanova, N. Pulido, A.I. Suarez, E. Rodriguez, and A. Rovira. 2000. Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes: increased abundance of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter proteins. *J Endocrinol* 164:187-95.

- Romijn, H.J., A.M. Habets, M.T. Mud, and P.S. Wolters. 1981. Nerve outgrowth, synaptogenesis and bioelectric activity in fetal rat cerebral cortex tissue cultured in serum-free, chemically defined medium. *Brain Res* 254:583-9.
- Rosenfeld, M.G., V.V. Lunyak, and C.K. Glass. 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20:1405-28.
- Rozanov, C.B., and M.B. Dratman. 1996. Immunohistochemical mapping of brain triiodothyronine reveals prominent localization in central noradrenergic systems. *Neuroscience* 74:897-915.
- Sachs, L.M., P.L. Jones, E. Havis, N. Rouse, B.A. Demeneix, and Y.B. Shi. 2002. Nuclear receptor corepressor recruitment by unliganded thyroid hormone receptor in gene repression during *Xenopus laevis* development. *Mol Cell Biol* 22:8527-38.
- Saelim, N., L.M. John, J. Wu, J.S. Park, Y. Bai, P. Camacho, and J.D. Lechleiter. 2004. Nontranscriptional modulation of intracellular Ca²⁺ signaling by ligand stimulated thyroid hormone receptor. *J Cell Biol* 167:915-24.
- Salto, C., J.M. Kindblom, C. Johansson, Z. Wang, H. Gullberg, K. Nordstrom, A. Mansen, C. Ohlsson, P. Thoren, D. Forrest, and B. Vennstrom. 2001. Ablation of TRalpha2 and a Concomitant Overexpression of alpha1 Yields a Mixed Hypo- and Hyperthyroid Phenotype in Mice. *Mol Endocrinol* 15:2115-28.
- Sampson, D., M.R. Pickard, A.K. Sinha, I.M. Evans, A.J. Leonard, and R.P. Ekins. 2000. Maternal thyroid status regulates the expression of neuronal and astrocytic cytoskeletal proteins in the fetal brain. *J Endocrinol* 167:439-45.
- Sap, J., L. de Magistris, H. Stunnenberg, and B. Vennstrom. 1990. A major thyroid hormone response element in the third intron of the rat growth hormone gene. *Embo J* 9:887-96.
- Sap, J., A. Munoz, K. Damm, Y. Goldberg, J. Ghysdael, A. Leutz, H. Beug, and B. Vennstrom. 1986. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324:635-40.
- Sarkar, P.K., and A.K. Ray. 1994. Synaptosomal T3 content in cerebral cortex of adult rat in different thyroidal states. *Neuropsychopharmacology* 11:151-5.
- Sarkar, P.K., N.D. Durga, J.J. Morris, and J.V. Martin. 2005. In vitro thyroid hormone rapidly modulates protein phosphorylation in cerebrocortical synaptosomes from adult rat brain. *Neuroscience*.
- Sasaki, S., L.A. Lesoon-Wood, A. Dey, T. Kuwata, B.D. Weintraub, G. Humphrey, W.M. Yang, E. Seto, P.M. Yen, B.H. Howard, and K. Ozato. 1999. Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative- feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *Embo J* 18:5389-98.
- Scanlan, T.S., K.L. Suchland, M.E. Hart, G. Chiellini, Y. Huang, P.J. Kruzich, S. Frascarelli, D.A. Crossley, J.R. Bunzow, S. Ronca-Testoni, E.T. Lin, D. Hatton, R. Zucchi, and D.K. Grandy. 2004. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med* 10:638-42.
- Schmidt-Ott, U.M., and D.D. Ascheim. 2006. Thyroid hormone and heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 3:114-9.
- Schneider, M.J., S.N. Fiering, S.E. Pallud, A.F. Parlow, D.L. St Germain, and V.A. Galton. 2001. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol* 15:2137-48.
- Schwartz, H.L., K.A. Strait, N.C. Ling, and J.H. Oppenheimer. 1992. Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J Biol Chem* 267:11794-9.

- Schwartz, P.M., P.R. Borghesani, R.L. Levy, S.L. Pomeroy, and R.A. Segal. 1997. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19:269-81.
- Shahrara, S., V. Drvota, and C. Sylven. 1999. Organ specific expression of thyroid hormone receptor mRNA and protein in different human tissues. *Biol Pharm Bull* 22:1027-33.
- Shank, L.C., and B.M. Paschal. 2005. Nuclear transport of steroid hormone receptors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 15:49-73.
- Sharma, D., and J.D. Fondell. 2002. Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7934-9.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstone, P.A. Cole, R.A. Casero, and Y. Shi. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941-53.
- Shibusawa, N., A.N. Hollenberg, and F.E. Wondisford. 2003a. Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J Biol Chem* 278:732-8.
- Shibusawa, N., K. Hashimoto, A.A. Nikrodhanond, M.C. Liberman, M.L. Applebury, X.H. Liao, J.T. Robbins, S. Refetoff, R.N. Cohen, and F.E. Wondisford. 2003b. Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *J Clin Invest* 112:588-97.
- Shim, S., Y. Kim, J. Shin, J. Kim, and S. Park. 2007. Regulation of EphA8 Gene Expression by TALE Homeobox Transcription Factors during Development of the Mesencephalon. *Mol Cell Biol* 27:1614-30.
- Shimizu, M., A. Takeshita, T. Tsukamoto, F.J. Gonzalez, and T. Osumi. 2004. Tissue-selective, bidirectional regulation of PEX11 alpha and perilipin genes through a common peroxisome proliferator response element. *Mol Cell Biol* 24:1313-23.
- Shin, D.J., and T.F. Osborne. 2003. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2). *J Biol Chem* 278:34114-8.
- Shin, D.J., M. Plateroti, J. Samarut, and T.F. Osborne. 2006. Two uniquely arranged thyroid hormone response elements in the far upstream 5' flanking region confer direct thyroid hormone regulation to the murine cholesterol 7alpha hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res* 34:3853-61.
- Shupnik, M.A., W.W. Chin, J.F. Habener, and E.C. Ridgway. 1985. Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J Biol Chem* 260:2900-3.
- Shupnik, M.A., W.W. Chin, D.S. Ross, M.F. Downing, J.F. Habener, and E.C. Ridgway. 1983. Regulation by thyroxine of the mRNA encoding the alpha subunit of mouse thyrotropin. *J Biol Chem* 258:15120-4.
- Siesser, W.B., J. Zhao, L.R. Miller, S.Y. Cheng, and M.P. McDonald. 2006. Transgenic mice expressing a human mutant beta1 thyroid receptor are hyperactive, impulsive, and inattentive. *Genes Brain Behav* 5:282-97.
- Silva, J.E., and R. Rabelo. 1997. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 136:251-64.
- Smith, C.L., and B.W. O'Malley. 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25:45-71.
- Smith, J.W., A.T. Evans, B. Costall, and J.W. Smythe. 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev* 26:45-60.

- Solomin, L., C.B. Johansson, R.H. Zetterstrom, R.P. Bissonnette, R.A. Heyman, L. Olson, U. Lendahl, J. Frisen, and T. Perlmann. 1998. Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord [In Process Citation]. *Nature* 395:398-402.
- Sornson, M.W., W. Wu, J.S. Dasen, S.E. Flynn, D.J. Norman, S.M. O'Connell, I. Gukovsky, C. Carriere, A.K. Ryan, A.P. Miller, L. Zuo, A.S. Gleiberman, B. Andersen, W.G. Beamer, and M.G. Rosenfeld. 1996. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384:327-33.
- Stecca, B., and A. Ruiz i Altaba. 2005. Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors. *J Neurobiol* 64:476-90.
- Stein, S.A., E.L. Oates, C.R. Hall, R.M. Grumbles, L.M. Fernandez, N.A. Taylor, D. Puett, and S. Jin. 1994. Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the hyt/hyt hypothyroid mouse. *Mol Endocrinol* 8:129-38.
- Stevens, D.A., C.B. Harvey, A.J. Scott, P.J. O'Shea, J.C. Barnard, A.J. Williams, G. Brady, J. Samarut, O. Chassande, and G.R. Williams. 2003a. Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone. *Mol Endocrinol* 17:1751-66.
- Stevens, D.A., C.B. Harvey, A.J. Scott, P.J. O'Shea, J.C. Barnard, A.J. Williams, G. Brady, J. Samarut, O. Chassande, and G.R. Williams. 2003b. Thyroid Hormone Activates Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in Bone. *Mol Endocrinol* 12:12.
- Stoka, A.M. 1999. Phylogeny and evolution of chemical communication: an endocrine approach. *J Mol Endocrinol* 22:207-25.
- Storey, N.M., S. Gentile, H. Ullah, A. Russo, M. Muessel, C. Erxleben, and D.L. Armstrong. 2006. Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5197-201.
- Strait, K.A., L. Zou, and J.H. Oppenheimer. 1992. Beta 1 isoform-specific regulation of a triiodothyronine-induced gene during cerebellar development. *Mol Endocrinol* 6:1874-80.
- Strait, K.A., H.L. Schwartz, V.S. Seybold, N.C. Ling, and J.H. Oppenheimer. 1991. Immunofluorescence localization of thyroid hormone receptor protein beta 1 and variant alpha 2 in selected tissues: cerebellar Purkinje cells as a model for beta 1 receptor-mediated developmental effects of thyroid hormone in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3887-91.
- Strobl, W., L. Chan, and W. Patsch. 1992. Differential regulation of hepatic apolipoprotein A-I and A-II gene expression by thyroid hormone in rat liver. *Atherosclerosis* 97:161-70.
- Sui, L., and M.E. Gilbert. 2003. Pre- and postnatal propylthiouracil-induced hypothyroidism impairs synaptic transmission and plasticity in area CA1 of the neonatal rat hippocampus. *Endocrinology* 144:4195-203.
- Sui, L., F. Wang, F. Liu, J. Wang, and B.M. Li. 2006. Dorsal hippocampal administration of triiodothyronine enhances long-term memory for trace cued and delay contextual fear conditioning in rats. *J Neuroendocrinol* 18:811-9.
- Suzuki, H., and S.Y. Cheng. 2003. Compensatory role of thyroid hormone receptor (TR) alpha 1 in resistance to thyroid hormone: study in mice with a targeted mutation in the TR beta gene and deficient in TR alpha 1. *Mol Endocrinol* 17:1647-55.
- Suzuki, H., M.C. Willingham, and S.Y. Cheng. 2002. Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* 12:963-9.
- Szabo, M., M.E. Stachura, N. Paleologos, D.E. Bybee, and L.A. Frohman. 1984. Thyrotropin-releasing hormone stimulates growth hormone release from the anterior pituitary of hypothyroid rats in vitro. *Endocrinology* 114:1344-51.

- Takabayashi, S., K. Umeki, E. Yamamoto, T. Suzuki, A. Okayama, and H. Katoh. 2006. A novel hypothyroid dwarfism due to the missense mutation Arg479Cys of the thyroid peroxidase gene in the mouse. *Mol Endocrinol* 20:2584-90.
- Takahashi, M., Y. Kondoh, H. Tashiro, N. Koibuchi, Y. Kuroda, and T. Tashiro. 2005. Monitoring synaptogenesis in the developing mouse cerebellum with an original oligonucleotide microarray. *J Neurosci Res* 80:777-88.
- Takayama, K., K. Kaneshiro, S. Tsutsumi, K. Horie-Inoue, K. Ikeda, T. Urano, N. Ijichi, Y. Ouchi, K. Shirahige, H. Aburatani, and S. Inoue. 2007. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene*.
- Tamura, S., Y. Morikawa, T. Hisaoka, H. Ueno, T. Kitamura, and E. Senba. 2005. Expression of mKirre, a mammalian homolog of *Drosophila kirre*, in the developing and adult mouse brain. *Neuroscience* 133:615-24.
- Taneja, R., B. Roy, J.L. Plassat, C.F. Zusi, J. Ostrowski, P.R. Reczek, and P. Chambon. 1996. Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR beta 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6197-202.
- Tenbaum, S.P., S. Juenemann, T. Schlitt, J. Bernal, R. Renkawitz, A. Munoz, and A. Baniahmad. 2003. Alien/CSN2 gene expression is regulated by thyroid hormone in rat brain. *Dev Biol* 254:149-60.
- Thijssen-Timmer, D.C., M.P. Schiphorst, J. Kwakkel, R. Emter, A. Kralli, W.M. Wiersinga, and O. Bakker. 2006. PGC-1alpha regulates the isoform mRNA ratio of the alternatively spliced thyroid hormone receptor alpha transcript. *J Mol Endocrinol* 37:251-7.
- Thompson, C.C., and G.B. Potter. 2000. Thyroid hormone action in neural development. *Cereb Cortex* 10:939-45.
- Thornton, J.W., E. Need, and D. Crews. 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301:1714-7.
- Tian, H., M.A. Mahajan, C.T. Wong, I. Habeos, and H.H. Samuels. 2006. The N-Terminal A/B domain of the thyroid hormone receptor-beta2 isoform influences ligand-dependent recruitment of coactivators to the ligand-binding domain. *Mol Endocrinol* 20:2036-51.
- Tinnikov, A., K. Nordstrom, P. Thoren, J.M. Kindblom, S. Malin, B. Rozell, M. Adams, O. Rajanayagam, S. Pettersson, C. Ohlsson, K. Chatterjee, and B. Vennstrom. 2002. Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor alpha1. *Embo J* 21:5079-87.
- Tomasi, T.E., E.C. Hellgren, and T.J. Tucker. 1998. Thyroid hormone concentrations in black bears (*Ursus americanus*): hibernation and pregnancy effects. *Gen Comp Endocrinol* 109:192-9.
- Torrance, C.J., J.E. Devente, J.P. Jones, and G.L. Dohm. 1997. Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrinology* 138:1204-14.
- Torres, S., B.P. Diaz, J.J. Cabrera, J.C. Diaz-Chico, B.N. Diaz-Chico, and A. Lopez-Guerra. 1999. Thyroid hormone regulation of rat hepatocyte proliferation and polyploidization. *Am J Physiol* 276:G155-63.
- Trajkovic, M., T.J. Visser, J. Mittag, S. Horn, J. Lukas, V.M. Darras, G. Raivich, K. Bauer, and H. Heuer. 2007. Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest*.

- Tsukada, Y., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M.E. Warren, C.H. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439:811-6.
- Tu, H.M., G. Legradi, T. Bartha, D. Salvatore, R.M. Lechan, and P.R. Larsen. 1999. Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 140:784-90.
- Turque, N., K. Palmier, S. Le Mevel, C. Alliot, and B.A. Demeneix. 2005. A rapid, physiologic protocol for testing transcriptional effects of thyroid-disrupting agents in premetamorphic *Xenopus* tadpoles. *Environ Health Perspect* 113:1588-93.
- Vanderpas, J. 2006. Nutritional epidemiology and thyroid hormone metabolism. *Annu Rev Nutr* 26:293-322.
- Varela, V., C.M. Rivolta, S.A. Esperante, L. Gruneiro-Papendieck, A. Chiesa, and H.M. Targovnik. 2006. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin Chem* 52:182-91.
- Vargiu, P., B. Morte, J. Manzano, J. Perez, R. de Abajo, J. Gregor Sutcliffe, and J. Bernal. 2001. Thyroid hormone regulation of rhes, a novel Ras homolog gene expressed in the striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 94:1-8.
- Vasudevan, N., S. Ogawa, and D. Pfaff. 2002. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. *Physiol Rev* 82:923-44.
- Vasudevan, N., H.K. Kia, M. Hadjimarkou, N. Koibuchi, W.W. Chin, D. Forrest, B. Vennstrom, and D. Pfaff. 2005. Retinoid-related receptor (ROR) alpha mRNA expression is altered in the brain of male mice lacking all ligand-binding thyroid hormone receptor (TR) isoforms. *Endocrine* 26:25-32.
- Velasco, L.F., M. Togashi, P.G. Walfish, R. de Paula Pessanha, F.N. Moura, G.B. Barra, P. Nguyen, R. Rebong, C. Yuan, L.A. Simeoni, R.C. Ribeiro, J.D. Baxter, P. Webb, and F.A. Neves. 2007. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem*.
- Venero, C., A. Guadano-Ferraz, A.I. Herrero, K. Nordstrom, J. Manzano, G.M. de Escobar, J. Bernal, and B. Vennstrom. 2005. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor {alpha}1 can be ameliorated by T3 treatment. *Genes Dev* 19:2152-63.
- Vincent, J., C. Legrand, A. Rabie, and J. Legrand. 1982. Effects of thyroid hormone on synaptogenesis in the molecular layer of the developing rat cerebellum. *J Physiol (Paris)* 78:729-38.
- Visser, W.F., C.W. van Roermund, L. Ijlst, H.R. Waterham, and R.J. Wanders. 2007. Metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Biochem J* 401:365-75.
- Volpato, C.B., and M.T. Nunes. 2001. Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptive role in hypothyroidism. *Neuroendocrinology* 74:220-6.
- Wagner, R.L., J.W. Apriletti, M.E. McGrath, B.L. West, J.D. Baxter, and R.J. Fletterick. 1995. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378:690-7.
- Wallace, V.A. 1999. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9:445-8.
- Walter, I.B. 1996. Triiodothyronine exerts a trophic action on rat sensory neuron survival and neurite outgrowth through different pathways. *Eur J Neurosci* 8:455-66.

- Wang, S.L., P.H. Su, S.B. Jong, Y.L. Guo, W.L. Chou, and O. Papke. 2005. In utero exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls and its relations to thyroid function and growth hormone in newborns. *Environ Health Perspect* 113:1645-50.
- Watanabe, M., S. Yasuo, T. Watanabe, T. Yamamura, N. Nakao, S. Ebihara, and T. Yoshimura. 2004. Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* 145:1546-9.
- Weber, T., U. Zimmermann, H. Winter, A. Mack, I. Kopschall, K. Rohbock, H.P. Zenner, and M. Knipper. 2002. Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2901-6.
- Wechsler-Reya, R.J., and M.P. Scott. 1999. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22:103-14.
- Wei, L.N., L. Chang, and X. Hu. 1999. Studies of the type I cellular retinoic acid-binding protein mutants and their biological activities. *Mol Cell Biochem* 200:69-76.
- Weinstein, S.P., J. Watts, P.N. Graves, and R.S. Haber. 1990. Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in ARL 15 cells: increased abundance of glucose transporter protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 126:1421-9.
- Weinstein, S.P., E. O'Boyle, M. Fisher, and R.S. Haber. 1994. Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology* 135:649-54.
- Weirich, R.T., H.L. Schwartz, and J.H. Oppenheimer. 1987. An analysis of the interrelationship of nuclear and plasma triiodothyronine in the sea lamprey, lake trout, and rat: evolutionary considerations. *Endocrinology* 120:664-77.
- Weiss, R.E., Y. Murata, K. Cua, Y. Hayashi, H. Seo, and S. Refetoff. 1998. Thyroid hormone action on liver, heart, and energy expenditure in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Endocrinology* 139:4945-52.
- Weiss, R.E., J. Xu, G. Ning, J. Pohlenz, B.W. O'Malley, and S. Refetoff. 1999. Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo J* 18:1900-4.
- Weiss, R.E., C. Korcarz, O. Chassande, K. Cua, P.M. Sadow, E. Koo, J. Samarut, and R. Lang. 2002. Thyroid hormone and cardiac function in mice deficient in thyroid hormone receptor-alpha or -beta: an echocardiograph study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E428-35.
- Wikstrom, L., C. Johansson, C. Salto, C. Barlow, A. Campos Barros, F. Baas, D. Forrest, P. Thoren, and B. Vennstrom. 1998. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *Embo J* 17:455-61.
- Wilcoxon, J.S., G.J. Nadolski, J. Samarut, O. Chassande, and E.E. Redei. 2007. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor alpha. *Behav Brain Res* 177:109-16.
- Williams, G.R. 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* 20:8329-42.
- Winter, H., C. Braig, U. Zimmermann, H.S. Geisler, J.T. Franzer, T. Weber, M. Ley, J. Engel, M. Knirsch, K. Bauer, S. Christ, E.J. Walsh, J. McGee, I. Kopschall, K. Rohbock, and M. Knipper. 2006. Thyroid hormone receptors TRalpha1 and TRbeta differentially regulate gene expression of Kcnq4 and prestin during final differentiation of outer hair cells. *J Cell Sci* 119:2975-84.
- Wissmann, M., N. Yin, J.M. Muller, H. Greschik, B.D. Fodor, T. Jenuwein, C. Vogler, R. Schneider, T. Gunther, R. Buettner, E. Metzger, and R. Schule. 2007. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat Cell Biol*.

- Wistuba, J., J. Mittag, C.M. Luetjens, T.G. Cooper, C.H. Yeung, E. Nieschlag, and K. Bauer. 2007. Male congenital hypothyroid Pax8^{-/-} mice are infertile despite adequate treatment with thyroid hormone. *J Endocrinol* 192:99-109.
- Wonders, C., and S.A. Anderson. 2005. Cortical interneurons and their origins. *Neuroscientist* 11:199-205.
- Woodruff-Pak, D.S., J.T. Green, S.I. Levin, and M.H. Meisler. 2006. Inactivation of sodium channel Scn8A (Na-sub(v)1.6) in Purkinje neurons impairs learning in Morris water maze and delay but not trace eyeblink classical conditioning. *Behav Neurosci* 120:229-40.
- Wrutniak, C., I. Cassar-Malek, S. Marchal, A. Rasclé, S. Heusser, J.M. Keller, J. Flechon, M. Dauca, J. Samarut, J. Ghysdael, and et al. 1995. A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J Biol Chem* 270:16347-54.
- Wu, S.Y., W.L. Green, W.S. Huang, M.T. Hays, and I.J. Chopra. 2005. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15:943-58.
- Wu, W., E.G. Niles, N. El-Sayed, M. Berriman, and P.T. LoVerde. 2006. *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors: sixteen new members and a novel subfamily. *Gene* 366:303-15.
- Xiao, Q., and V.M. Nikodem. 1998. Apoptosis in the developing cerebellum of the thyroid hormone deficient rat. *Front Biosci* 15:A52-7.
- Xie, Z., S. Chang, Y. Oda, and D.D. Bikle. 2006. Hairless suppresses vitamin D receptor transactivation in human keratinocytes. *Endocrinology* 147:314-23.
- Xiong, S., S.S. Chirala, M.H. Hsu, and S.J. Wakil. 1998. Identification of thyroid hormone response elements in the human fatty acid synthase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12260-5.
- Xu, Q., C.P. Wonders, and S.A. Anderson. 2005. Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* 132:4987-98.
- Yamada, M., Y. Saga, N. Shibusawa, J. Hirato, M. Murakami, T. Iwasaki, K. Hashimoto, T. Satoh, K. Wakabayashi, M.M. Taketo, and M. Mori. 1997. Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10862-7.
- Yamane, K., C. Toumazou, Y. Tsukada, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Wong, and Y. Zhang. 2006. JHDM2A, a JmJc-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125:483-95.
- Yaoita, Y., and D.D. Brown. 1990. A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev* 4:1917-24.
- Yaoita, Y., Y.B. Shi, and D.D. Brown. 1990. *Xenopus laevis* alpha and beta thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7090-4.
- Yasuo, S., N. Nakao, S. Ohkura, M. Iigo, S. Hagiwara, A. Goto, H. Ando, T. Yamamura, M. Watanabe, T. Watanabe, S. Oda, K. Maeda, G.A. Lincoln, H. Okamura, S. Ebihara, and T. Yoshimura. 2006. Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology* 147:432-40.
- Ye, P., Y. Xing, Z. Dai, and A.J. D'Ercole. 1996. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* 95:44-54.
- Yen, P.M. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097-142.

- Yen, P.M. 2006. Thyroid hormones and 3,5-diiodothyropropionic acid: new keys for new locks. *Endocrinology* 147:1598-601.
- Yen, P.M., X. Feng, F. Flamant, Y. Chen, R.L. Walker, R.E. Weiss, O. Chassande, J. Samarut, S. Refetoff, and P.S. Meltzer. 2003. Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep* 4:581-587.
- Ying, H., O. Araki, F. Furuya, Y. Kato, and S.Y. Cheng. 2007. Impaired adipogenesis caused by a mutated thyroid hormone α 1 receptor. *Mol Cell Biol*.
- Yoshimura, T. 2006. Molecular mechanism of the photoperiodic response of gonads in birds and mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144:345-50.
- Yoshimura, T., S. Yasuo, M. Watanabe, M. Iigo, T. Yamamura, K. Hirunagi, and S. Ebihara. 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426:178-81.
- You, S.H., K.J. Gauger, R. Bansal, and R.T. Zoeller. 2006. 4-Hydroxy-PCB106 acts as a direct thyroid hormone receptor agonist in rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 257-258:26-34.
- Yu, F., S. Gothe, L. Wikstrom, D. Forrest, B. Vennstrom, and L. Larsson. 2000. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1545-R1554.
- Zhang, J., and S. Hughes. 2006. Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol* 208:453-61.
- Zhang, Y., L. Yin, and F.B. Hillgartner. 2003. SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC α transcription in hepatocytes. *J Lipid Res* 44:356-68.
- Zimmermann, H. 2006. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch* 452:573-88.
- Zinman, T., V. Shneyvays, N. Tribulova, M. Manoach, and A. Shainberg. 2006. Acute, nongenomic effect of thyroid hormones in preventing calcium overload in newborn rat cardiocytes. *J Cell Physiol* 207:220-31.
- Zoeller, R.T. 2005. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: New studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Mol Cell Endocrinol* 242:10-5.
- Zoeller, R.T., A.L. Dowling, A.A. Vas, Y.A. Evrard, Y. Lun, A. Aulehla, L. Gan, and R.L. Johnson. 2000. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. *Endocrinology* 141:181-9.
- Zou, L., S.G. Hagen, K.A. Strait, and J.H. Oppenheimer. 1994. Identification of thyroid hormone response elements in rodent Pcp-2, a developmentally regulated gene of cerebellar Purkinje cells. *J Biol Chem* 269:13346-52.

RESUME

L'hormone thyroïdienne (T3) a des fonctions pléiotropiques au cours du développement. Un déficit congénital de T3 est responsable d'un retard mental sévère. Grâce à des souris possédant un transgène rapporteur, nous avons montré que l'activité de l'hormone est très hétérogène dans le cerveau pré et post-natal. T3 agit *via* les récepteurs nucléaires TR pour réguler la transcription de gènes-cibles. De nouveaux gènes-cibles ont été identifiés dans le cervelet post-natal, mais la cascade de signalisation demeure inconnue, en raison d'interactions cellulaires complexes. Pour supprimer la réponse à T3 à un moment donné, dans une cellule donnée, des souris exprimant de façon conditionnelle un récepteur TR α 1 muté ont été générées. Les mutants constitutifs ont un phénotype très proche de l'hypothyroïdie, ce qui confirme l'implication majeure du récepteur TR α 1 non lié à T3 dans la pathogénie de l'hypothyroïdie. Le système conditionnel permettra de disséquer le mécanisme d'action de T3 *in vivo*.

PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGIC EFFECTS OF UNLIGANDED THYROID HORMONE RECEPTOR ALPHA 1 DURING MOUSE DEVELOPMENT

ABSTRACT

Thyroid hormone (T3) has pleiotropic functions during development. Congenital hypothyroidism results in severe mental retardation. Using transgenic reporter mice, we showed that T3 action is highly heterogeneous in pre and post-natal brain. The regulation of gene expression by T3 involves binding of the hormone to TR nuclear receptors acting as T3-dependant transcription factors. We identified new T3 direct target genes in postnatal cerebellum, but the T3 signaling cascade is still unknown, because of complexe cell cell interactions. To suppress T3 response in a specific cell type and at a specific time, we created new transgenic mice expressing a mutated TR α 1 in a conditional manner. Constitutive mutants have a hypothyroid like phenotype. This confirms the importance of unliganded TR α 1 receptor in hypothyroidism pathogenesis. The conditional system will permit to dissect *in vivo* T3 action.